



DESDE 1902  
INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

# **Viroma pulmonar em doentes submetidos a ventilação mecânica em Unidades de Cuidados Intensivos**

**Raquel Inês Afonso de Nazareth**

Dissertação para obtenção do  
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientador:

Prof. Doutor Paulo Paixão, Faculdade de Ciências Médicas,  
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadores:

Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria de Jesus Chasqueira, Faculdade de Ciências  
Médicas, Universidade Nova de Lisboa;

Prof. Doutor Pedro Póvoa, Faculdade de Ciências Médicas,  
Universidade Nova de Lisboa

**Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa,  
Laboratório de Microbiologia**

**Julho 2018**



Esta dissertação foi escrita de acordo com as regras  
anteriores ao novo acordo ortográfico.



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Doutor Paulo Paixão, por me ter aceite para participar neste projecto e pelo seu apoio inequívoco, desde então.

À minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria de Jesus Chasqueira, a principal responsável pela concretização desta tese de mestrado.

Ao Prof. Doutor Pedro Póvoa, por todo o entusiasmo com que me contagiou desde sempre e por ter aceite ajudar-me em mais um projecto.

À Dra. Lúcia Rodrigues, pela ajuda, incentivo, paciência e ânimo que me ofereceu desde a fase inicial. À Dra. Augusta Marques e aos meus colegas deste mestrado, Diana Cangueiro, Eneida Varela e Sérgio Fontes pela amizade e companheirismo.

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Madalena Almeida Santos, um agradecimento especial pela sua colaboração na parte prática deste trabalho.

Ao grupo do Prof. Doutor João Paulo Gomes, um agradecimento especial pela participação na parte prática deste trabalho.

Ao Dr. António Messias, que, para além de ter permitido a realização desta tese no nosso serviço, garantiu a concretização da parte prática e me incentivou a ir mais além.

Aos meus colegas de trabalho, nomeadamente à Dra. Úrsula Segura e ao Dr. Rui Valente, pela ajuda que me ofereceram na colheita das amostras.

À Dra. Catarina Conceição e Dra. Lia Lêdo que fizeram as colheitas das amostras e recolheram os dados dos doentes na UCIP do H. São Francisco de Xavier. À Dra. Carolina Paulino, pela sua amizade de sempre e pela sua ajuda.

Finalmente, ao Cláudio, aos meus pais, os meus companheiros de vida, e aos meus sogros, o meu agradecimento pelo tempo, pelo apoio e pela disponibilidade.



## Resumo

O viroma pulmonar é parte integrante do microbioma humano e a sua caracterização em indivíduos saudáveis poderá contribuir para uma melhor compreensão das alterações que surgem na doença e, consequentemente, influenciar a abordagem e o tratamento dos doentes com infecção respiratória baixa.

O objectivo deste trabalho foi o de avaliar a presença de vírus respiratórios nas vias aéreas inferiores de indivíduos sob ventilação mecânica invasiva, com e sem infecção respiratória baixa, Grupo 2 e Grupo 1, respectivamente.

Foram estudadas 44 amostras de mini-lavado bronco-alveolar de doentes com média etária na sétima década, 20 do Grupo 1 e 24 do Grupo 2, internados por patologia aguda grave em Unidades de Cuidados Intensivos de dois hospitais da área de Lisboa. A análise metagenómica das amostras, na fase preliminar, mostrou elevada contaminação por sequências genómicas humanas, inviabilizando a detecção de genomas virais. O estudo prosseguiu com a utilização de PCR em tempo real para análise de 15 vírus.

Os vírus respiratórios testados estavam presentes em 30% dos doentes do Grupo 1, Influenza AH3 (n=2), Parainfluenza 1/3 (n=2), Rinovírus humano (n=2), Vírus sincicial respiratório (n=1) e Metapneumovírus humano (n=1). No Grupo 2, em 50% dos doentes detectaram-se vírus respiratórios, nomeadamente Influenza AH3 (n=3), Vírus sincicial respiratório (n=3), Metapneumovírus humano (n=3), Rinovírus humano (n=3), Bocavírus humano (n=2) e Enterovírus humano (n=1). Em duas amostras do Grupo 1 e em três amostras do Grupo 2, registou-se a detecção simultânea de dois vírus.

Os resultados obtidos sugerem que nos doentes sem infecção respiratória existe uma comunidade viral pulmonar, da qual fazem parte vírus respiratórios, que parecem infectar assintomaticamente o aparelho respiratório, sendo por isso a favor da existência de um viroma a este nível.

**Palavras-chave:** microbioma humano, viroma pulmonar, vírus respiratórios, análise metagenómica, PCR em tempo real





## Abstract

Respiratory virome is an integral part of the human microbiome and its characterization in healthy individuals may contribute to a better understanding of the changes that arise in the disease and, consequently, influence the approach and treatment of patients with lower respiratory infection.

The aim of this study was to evaluate the presence of respiratory viruses in the lower airways of individuals undergoing invasive mechanical ventilation, with and without lower respiratory infection, Group 2 and Group 1, respectively.

We studied 44 mini-bronchoalveolar lavage samples from patients with mean age in the seventh decade, 20 from Group 1 and 24 from Group 2, who were hospitalized for severe acute disease in Intensive Care Units of two hospitals in the Lisbon area. The metagenomic analysis of the samples, in the preliminary phase, showed high contamination by human genomic sequences, making it impossible to detect viral genomes. The study continued with the use of real-time PCR for analysis of 15 viruses.

The respiratory viruses tested were present in 30% of patients in Group 1, Influenza AH3 (n = 2), Parainfluenza 1/3 (n = 2), Human rhinovirus (n = 2), Respiratory syncytial virus (n = 1) and Human metapneumovirus (n = 1). In Group 2, respiratory viruses were detected in 50% of the patients, Influenza AH3 (n = 3), Respiratory syncytial virus (n = 3), Human metapneumovirus (n = 3), Human rhinovirus (n = 3), Human bocavirus (n = 2) and Human enterovirus (n = 1). In two samples from Group 1 and three samples from Group 2, the simultaneous detection of two viruses was recorded.

The results obtained suggest that in patients without respiratory infection there is a lung viral community, which includes respiratory viruses, which seem to infect the lower respiratory tract asymptotically and therefore favors the existence of a virome at this level.

**Key-words:** human microbiome, respiratory virome, respiratory virus, metagenomic analysis, real-time PCR



# Índice

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>i</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>v</b>
<b>Índice.....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Anexos.....</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de Gráficos.....</b>	<b>xv</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>xvii</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>xix</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Microbioma humano.....	1
1.1.1 Definição de microbioma.....	1
1.1.2 Viroma humano.....	2
1.1.3 Aparelho respiratório.....	3
1.1.4 Microbioma pulmonar.....	5
1.1.5 Viroma pulmonar.....	6
1.2 Infecções respiratórias virais.....	9

1.3 Principais vírus respiratórios.....	12
1.3.1 <i>Adenoviridae</i> : Adenovírus humano.....	12
1.3.2 <i>Orthomyxoviridae</i> : Vírus Influenza.....	15
1.3.3 <i>Paramyxoviridae</i> : Vírus Parainfluenza humano, Vírus sincicial respiratório, Metapneumovírus humano.....	18
1.3.3.1 Vírus Parainfluenza humano.....	18
1.3.3.2 Vírus sincicial respiratório.....	20
1.3.3.3 Metapneumovírus humano.....	22
1.3.4 <i>Coronaviridae</i> : Coronavírus humano.....	23
1.3.5 <i>Picornaviridae</i> : Rinovírus humano, Enterovírus humano.....	25
1.3.5.1 Rinovírus humano.....	26
1.3.5.2 Enterovírus humano.....	27
1.3.6 <i>Parvoviridae</i> : Bocavírus humano.....	29
1.4. Diagnóstico dos vírus respiratórios.....	30
1.4.1 Cultura celular .....	31
1.4.2 Detecção de antígenos.....	33
1.4.3 Serologia.....	34
1.4.4 Testes de amplificação de ácidos nucleicos.....	34
1.4.5 Análise metagenómica.....	36
1.4.6 Comparação entre PCR e análise metagenómica.....	37

1.5 Objectivos do estudo.....	38
<b>2. Material e métodos.....</b>	<b>41</b>
2.1 Selecção da população estudada.....	41
2.2 Recolha de dados.....	41
2.3 Colheita e armazenamento de amostras.....	43
2.4 Procedimentos experimentais.....	44
2.4.1 Técnicas de extracção de ácidos nucleicos.....	44
2.4.2 Sequenciação do material genómico viral .....	46
2.4.2.1 Primeiro ensaio.....	46
2.4.2.2 Segundo ensaio.....	46
2.4.2.3 Transcrição reversa aleatória, amplificação de RNA viral e Sequenciação de Nova Geração.....	48
2.4.2.4 Análise Bioinformática.....	49
2.4.3 Técnica de PCR em tempo real.....	49
<b>3. Resultados.....</b>	<b>55</b>
3.1 Características dos doentes incluídos no estudo.....	55
3.2 Metagenómica.....	59
3.2.1 Ensaio piloto.....	59
3.2.2 Primeiro ensaio preliminar.....	60
3.2.3 Segundo ensaio preliminar.....	61

3.3 Análise das amostras por PCR em tempo real.....	63
<b>4. Discussão dos resultados e Conclusão.....</b>	<b>71</b>
<b>5. Referências bibliográficas.....</b>	<b>79</b>

## Índice de Anexos

<b>Anexo I</b> - Protocolo de extracção de ácidos nucleicos - kit QIAmp MinElute Virus Spin, QIAGEN .....	95
<b>Anexo II</b> - <i>Primers</i> utilizados para transcrição reversa e amplificação aleatória de RNA viral.....	97
<b>Anexo III</b> - Painei 1 - <i>Pentaplex</i> : Influenza A e subtipos H1 e H3, Influenza B e MS2	99
<b>Anexo IV</b> - Painei 2 - <i>Triplex</i> : VSR A/B, VPI 1 e 3 e Adenovírus.....	101
<b>Anexo V</b> - Painei 3 - <i>Quadriplex</i> : VPI 2 e 4, EVh, RVh e MPVh.....	103
<b>Anexo VI</b> - Painei 4 - <i>Duplex</i> : CoVh grupo 1 (229E, NL63), CoVh grupo 2 (OC43, HKU1).....	105
<b>Anexo VII</b> - Painei 5 – BoVh.....	107





## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - O microbioma humano e o subgrupo constituinte do viroma .....	1
<b>Figura 2</b> - Aparelho respiratório humano e locais de colheita das amostras clínicas.....	4
<b>Figura 3</b> - Técnica de PCR.....	35
<b>Figura 4</b> - Comparação entre qPCR e análise metagenómica.....	38
<b>Figura 5</b> - Combicath®.....	43
<b>Figura 6</b> - Protocolo de extracção de ácidos nucleicos.....	45
<b>Figura 7</b> - Esquema do tratamento diferencial das amostras para deplecção do material eucariota .....	47



## Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1</b> - Número de doentes por Grupo.....	55
<b>Gráfico 2</b> - Número de comorbilidades por doente em cada Grupo.....	57
<b>Gráfico 3</b> - Comparação do impacto das diferentes estratégias de extracção de RNA no número de <i>reads</i> dedicados a genomas virais (B) e ao genoma humano (A).....	62
<b>Gráfico 4</b> - Comparação das diferentes estratégias de extracção de RNA na identificação das espécies virais presentes na amostra e do seu impacto no número de <i>reads</i> dedicados a cada vírus.....	63
<b>Gráfico 5</b> - Resultado das amostras analisadas por qPCR.....	65
<b>Gráfico 6</b> - Número de amostras com zero, um e dois vírus.....	66
<b>Gráfico 7</b> - Número de amostras do Grupo 1 e do Grupo 2 com os vírus testados.....	67
<b>Gráfico 8</b> - Evolução semanal da taxa de admissão por gripe em UCI em cinco épocas, entre 2012-17 .....	75



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Estudos de análise metagenómica sobre viroma respiratório.....	8
<b>Tabela 2</b> - Vírus respiratórios que causam PAC.....	10
<b>Tabela 3</b> - Características gerais dos vírus respiratórios.....	13
<b>Tabela 4</b> - Classificação actual dos Enterovírus.....	27
<b>Tabela 5</b> - Métodos de diagnóstico de vírus respiratórios.....	31
<b>Tabela 6</b> - Comparação dos métodos de identificação viral.....	32
<b>Tabela 7</b> - Índice de gravidade APACHE II.....	42
<b>Tabela 8</b> - Componentes do índice de gravidade SAPS II.....	42
<b>Tabela 9</b> - Painéis utilizados na qPCR para pesquisa dos agentes virais em estudo no presente trabalho.....	51
<b>Tabela 10</b> - Painel utilizado na qPCR para pesquisa de Bocavírus humano.....	52
<b>Tabela 11</b> - Programa utilizado no RotorGene.....	53
<b>Tabela 12</b> - Dados demográficos dos doentes.....	55
<b>Tabela 13</b> - Comorbilidades da população em estudo.....	56
<b>Tabela 14</b> - Comparação entre os dois Grupos relativamente à gravidade, evolução e desfecho dos doentes.....	57
<b>Tabela 15</b> - Comparação dos dados apresentados na tabela 14, considerando os doentes que sobreviveram e os falecidos.....	58
<b>Tabela 16</b> - Resultados do exame cultural bacteriológico e micológico dos produtos biológicos.....	59

<b>Tabela 17</b> - Número de <i>reads</i> dedicados a genomas virais em cada amostra sequenciada (ensaio piloto).....	60
<b>Tabela 18</b> - Vírus identificados por qPCR e por metagenómica, no ensaio piloto, utilizando duas abordagens ( <i>software</i> Taxonomer e Base de dados NCBI).....	60
<b>Tabela 19</b> - Número de <i>reads</i> dedicados a genomas virais em cada amostra sequenciada (primeiro ensaio preliminar).....	61
<b>Tabela 20</b> - Vírus detectados nas amostras clínicas através de PCR em tempo real e respectivos Ct's.....	64
<b>Tabela 21</b> – Comparação entre os dois Grupos, quanto ao número de amostras positivas e respectivos vírus detectados.....	65
<b>Tabela 22</b> - Data de colheita das amostras e respectivos vírus detectados.....	67
<b>Tabela 23</b> - Comparação entre os doentes com amostras positivas e negativas, nos dois Grupos.....	69
<b>Tabela 24</b> - Percentagem de <i>reads</i> atribuíveis a genoma humano e a genomas virais obtidos em estudos sobre viroma pulmonar utilizando aspirados naso-faríngeos.....	72

## **Abreviaturas**

**APACHE II** – *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*

**ARDS** – *Acute Respiratory Distress Syndrome*

**BoVh** – Bocavírus humano

**BSL** – *biosafety level*

**CDC** – *Centers for Disease Control and Prevention*

**cDNA** – DNA complementar

**cm** - centímetro

**CoVh** – Coronavírus humano

**Ct** – *Cycle threshold*

**Cy5** – *cyanine*

**D** - dia

**dez** - dezembro

**DGS** – Direcção Geral da Saúde

**dL** – decilitro

**DNA** – *deoxyribonucleic acid*

**DNase** - desoxirribonuclease

**dNTP** - desoxirribonucleótidos

**ds** – *double strand*

**DTT** – ditioneitol

**EVh** – Enterovírus humano

**ECDC** – *European Centre for Disease Prevention and Control*

**EIA** – Ensaio imunozimático

**EPIC** – *Etiology of Pneumonia in the Community*

**EUA** – Estados Unidos da América

**FAM** – 6'-carboxyfluorescein

**fev** - fevereiro

**FQ** – Fibrose quística

**HA** - hemaglutinina

**H1N1 pdm09** – vírus Influenza H1N1, responsável pela pandemia de gripe em 2009

**HBA** – Hospital Beatriz Ângelo

**HBSS** – *Hank's Balanced Salt Solution*

**HC** - hemoculturas

**HIV** – *Human immunodeficiency virus*

**HN** – hemaglutinina-neuraminidase

**HSFX** – Hospital de São Francisco de Xavier

**ICTV** – *International Committee on Taxonomy of Viruses*

**IFD** – Imunofluorescência directa

**INSA** – *Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*

**IRB** – infecção respiratória baixa

**ITS** – *internal transcribed spacer*

**JOE** – 6-carboxy-4'5'-dichloro-2'7'-dimethoxyfluorescein



**L** – litro

**LBA** – lavado bronco-alveolar

**M** - masculino

**mEq** – miliequivalente

**MERS** – *Middle East Respiratory Syndrome*

**mg** – miligrama

**MgSO<sub>4</sub>** – sulfato de magnésio

**mL** – mililitro

**mM** - milimol

**mmHg** – milímetro de mercúrio

**MPVh** – Metapneumovírus humano

**n** - número

**Na** – não aplicável

**NA** - neuraminidase

**NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*

**NF** – nasofaríngea

**nm** – nanómetro

**%** - percentagem

**PAC** – pneumonia adquirida na comunidade

**pb** – pares de bases

**PCR** – *polymerase chain reaction*

**PNVG** – Plano Nacional de Vigilância da Gripe

**qPCR** – PCR em tempo real

**RDD** – tampão (componente do RNase-free DNase set, Qiagen)

**RNA** – *ribonucleic acid*

**RNases** – ribonucleases

**ROX** – *6-carboxy-X-rhodamine*

**rRNA 16S** – RNA ribossômico 16S

**rpm** – rotação por minuto

**rtPCR** – *reverse transcription-Polymerase chain reaction*

**RT** – *reverse transcriptase*

**RVh** – Rinovírus humano

**SAPS II** – *Simplified Acute Physiology Score*

**SARS** – *Severe acute respiratory syndrome*

**SB** – secreções brônquicas

**SIDA** – síndrome de imunodeficiência adquirida

**ss** – *single strand*

**tRNA** – RNA transportador

**UC** - urocultura

**UCI** – Unidade de Cuidados Intensivos

**UCIP** – Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente

**VMI** – ventilação mecânica invasiva

**VPI** – Vírus Parainfluenza humano

**VSR** – Vírus Sincicial Respiratório

**WHO** – *World Health Organization*

**μL** - microlitro

**μm** – micrómetro

**μM** - micromol

~ - aproximadamente

°C – graus *Celcius*

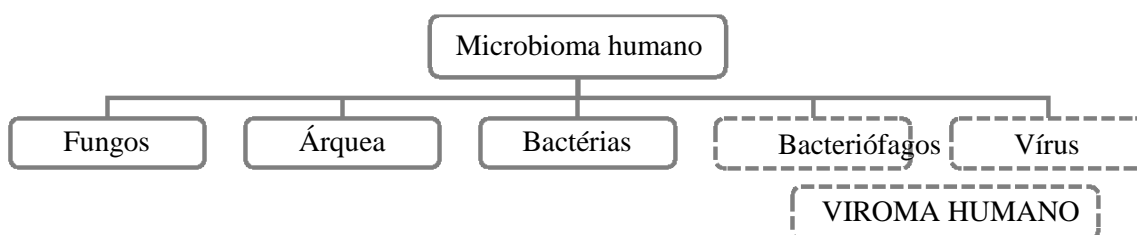


## 1. Introdução

### 1.1 Microbioma humano

#### 1.1.1 Definição de microbioma

O conceito de microbioma humano foi inicialmente sugerido em 2001, por Joshua Lederberg, prémio Nobel de Medicina, para definir a comunidade ecológica de microorganismos que partilham o nosso organismo, estabelecendo uma relação de comensalismo, simbiose ou patogenicidade com o mesmo (1). Em 2008, o *Human Microbiome Project* acrescentou a esta definição o conceito de material genético pertencente a bactérias, vírus, fungos e arquea que residem e interagem num determinado ambiente, neste caso, o Homem (2).



**Figura 1** - O microbioma humano e o subgrupo constituinte do viroma (*adaptado de Mitchell AB, 2016*) (3).

O *Human Microbiome Project* trata-se de um consórcio internacional que marcou uma mudança de paradigma, em que se passou da investigação de microorganismos de forma isolada à investigação de comunidades microbianas (4). O seu objectivo foi caracterizar o microbioma humano e analisar o papel dos microorganismos na saúde e na doença. Na primeira fase, priorizaram-se cinco órgãos, nomeadamente a pele, cavidade nasal, orofaringe, intestino e vagina (5). As bactérias são o principal constituinte da biomassa presente nestes ecossistemas, embora fungos, arquea e vírus pareçam ter também um papel importante. Tal como foi demonstrado para o componente bacteriano, as outras espécies residentes apresentam variação inter-individual, o que se associa ao estado de

saúde do indivíduo.

Estima-se que na composição do microbioma humano intestinal existam 10 a 100 triliões de células microbianas, independentemente do estado de saúde do indivíduo (6). No total, as células humanas do nosso organismo quantificam-se em cerca de um décimo das células bacterianas que nos habitam e o nosso material genético em cerca de um centésimo do material genético bacteriano (7).

O componente bacteriano do microbioma estável, em situação de homeostasia, foi inicialmente descrito em 1958, em amostras da cavidade oral e, posteriormente, começou a ser caracterizada a flora intestinal, em determinadas doenças deste órgão (8). Nos últimos dez anos, as técnicas de diagnóstico independentes da cultura, nomeadamente as técnicas de detecção de ácidos nucleicos, assim como o desenvolvimento de algoritmos bioinformáticos, permitiram demonstrar a presença de comunidades complexas de microorganismos que residem na maioria das superfícies epiteliais, como a pele e as mucosas, onde constituem um segundo genoma (7). Houve uma expansão do conhecimento sobre o microbioma, previamente denominado de microflora, assim como da percepção do seu papel crucial na homeostasia do organismo humano, uma vez que modela o sistema imunitário presente nas mucosas das fossas nasais, cavidade oral, tubo digestivo e aparelho génito-urinário. Até à data, o microbioma do tracto gastrointestinal tem sido o mais estudado, devido ao facto de apresentar uma biomassa significativamente superior em relação aos restantes órgãos e à facilidade na colheita de amostras. Foi estabelecida uma associação entre a disfunção do microbioma intestinal e alguns processos fisiopatológicos, nomeadamente a obesidade, a doença arterial coronária, a Diabetes tipo 2, a infecção por *Clostridium difficile*, colites, doenças inflamatórias intestinais e infecções por microorganismos multirresistentes (9, 10, 11).

### **1.1.2 Viroma humano**

O estudo do viroma humano tem sido negligenciado, por comparação com o microbioma bacteriano, devido a vários factores, nomeadamente a ausência de marcadores moleculares virais universais, tais como os que existem para as bactérias (RNA ribossómico 16S) (12) e os fungos (região ITS, *internal transcribed spacer*,

localizada entre as duas subunidades de RNA), a heterogeneidade dos elementos que constituem o viroma, a dificuldade em trabalhar com amostras muito pequenas, devido à interferência de grandes quantidades de material genético do hospedeiro, instrumentos de bioinformática inadequados para a sua análise e a ausência de bases de dados robustas (13).

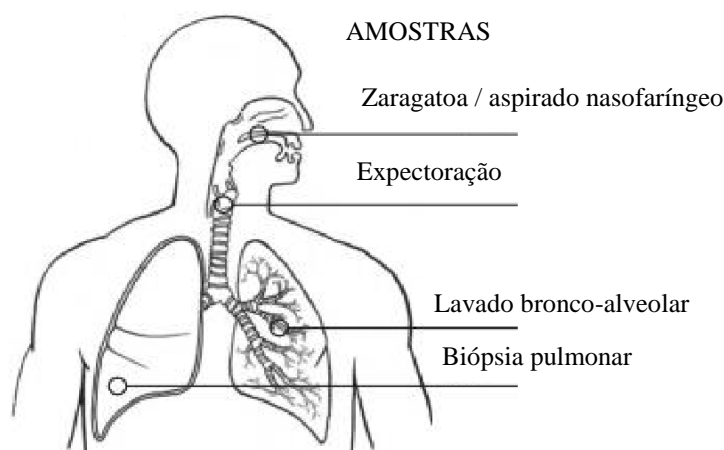
A informação disponível aponta, no entanto, no sentido do viroma humano incluir vírus patogénicos, vírus residentes em tecidos saudáveis, elementos derivados de vírus integrados nos cromossomas humanos e bacteriófagos (14). Os vírus poderão ter um papel benéfico ou deletério na saúde humana, dependendo da interacção que estabelecem com o hospedeiro, com outros vírus e com as bactérias. Os bacteriófagos parecem influenciar a flora bacteriana que os hospeda. Por outro lado, a presença de vírus no epitélio do hospedeiro, a sua primeira linha de defesa, pode torná-lo mais susceptível a infecções bacterianas.

Alguns estudos mostraram que o viroma das mucosas da cavidade oral, tracto gastrointestinal e tracto respiratório é distinto, sugerindo que o ambiente local tem um papel fundamental na sua modulação (13). Para além de ser específico de cada órgão, o viroma parece manter-se estável ao longo do tempo. Num estudo longitudinal realizado por Minot *et al*, que pretendeu avaliar a composição de vírus no intestino de um indivíduo adulto saudável ao longo do tempo, verificou-se que cerca de 80% persistia no final do estudo, decorridos dois anos e meio. Contudo, alguns vírus, sobretudo bacteriófagos, originaram espécies quase distintas das iniciais no final do mesmo período (15).

### **1.1.3 Aparelho respiratório**

Neste estudo vamos debruçar-nos sobre o microbioma de um órgão distinto, o pulmão, que, em conjunto com as vias aéreas, constitui o aparelho respiratório. De uma forma simplificada, este aparelho divide-se em dois andares, superior e inferior. A glote, o espaço virtual que se encontra entre as cordas vocais, estabelece o limite para esta divisão. O aparelho respiratório superior inicia-se nas fossas nasais e vai até à laringe, incluindo a naso e a orofaringe. O aparelho respiratório inferior é constituído pela traqueia e os brônquios, cujas ramificações, os bronquíolos, ductos alveolares e alvéolos

terminam no parênquima pulmonar. Compreende-se que este sistema de órgãos esteja constantemente exposto a agentes bacterianos e virais, por inalação de partículas através das fossas nasais e cavidade oral, ingestão alimentar, conversação e bocejo (16).



**Figura 2** - Aparelho respiratório humano e locais de colheita das amostras clínicas (*adaptado de Mitchell AB, 2016*) (3).

Estudos de microbioma bacteriano mostraram que as bactérias presentes no aparelho respiratório inferior reflectiam, de uma forma geral, a composição do aparelho respiratório superior, o que se relacionava com a sua migração transitória, por microaspiração, e não à presença de comunidades independentes (17). Contudo, a biomassa seria inferior quando comparada com o aparelho respiratório superior. Admitia-se ainda que o microbioma do tracto respiratório inferior podia estar relacionado com a contaminação do tracto superior, durante a colheita de amostras.

Desta forma, o estudo do microbioma das vias aéreas inferiores é uma área de interesse com vários desafios, nomeadamente o processo de colheita das amostras e o seu desenho, com o objectivo de uma melhor percepção das comunidades microbianas nesta localização e as relações que estabelecem entre si (16).

A colheita de amostras do tracto respiratório superior é um procedimento relativamente fácil, nomeadamente o aspirado nasofaríngeo, a zaragatoa da nasofaringe, fossas nasais e orofaringe, e a colheita de expectoração (figura 2). Contudo, a aspiração de secreções



traqueais, o lavado bronco-alveolar e a biópsia pulmonar consistem em procedimentos invasivos, com dificuldade crescente, pela ordem indicada. Assim se explica a dificuldade na sua obtenção e o número limitado de estudos utilizando este tipo de amostras.

#### **1.1.4 Microbioma pulmonar**

Curiosamente, o pulmão não foi incluído como um dos locais a pesquisar na fase inicial do *Human Microbiome Project*, sendo que, apenas na última década, os investigadores começaram a interessar-se por este órgão, com a criação do *Lung HIV Microbiome Project*, em 2009, patrocinado pelo *National Heart, Lung and Blood Institute* (7, 18). Até à data, o pulmão era considerado um órgão estéril, o que se explicava pelos mecanismos protectores das vias aéreas superiores e pela função de barreira da mucosa das vias aéreas inferiores. A presença de bactérias nas vias aéreas inferiores era interpretada como um fenómeno patológico, com base em exames microbiológicos culturais (19).

No início da década actual, estudos baseados em métodos laboratoriais independentes da cultura demonstraram a presença de comunidades bacterianas com alguma diversidade nos seus elementos, mas em escassa quantidade em pulmões de indivíduos saudáveis, não fumadores. Segundo um estudo realizado por Erb-Downward *et al*, existem variações regionais do microbioma das vias aéreas, num mesmo indivíduo, em situações patológicas (20). Neste estudo, foram analisadas amostras de lavado bronco-alveolar através da técnica de pirosequenciação, utilizando amplicões de rRNA 16S. As amostras pertenciam a três indivíduos saudáveis, sete indivíduos fumadores, mas sem patologia pulmonar e quatro doentes com doença pulmonar crónica obstrutiva de etiologia tabágica. Foi identificado um *core* de bactérias, constituído por *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Veillonella* e *Porphyromonas*. Os indivíduos com patologia pulmonar apresentavam diferenças microanatômicas nas comunidades bacterianas no mesmo pulmão. Dickson *et al*, demonstraram que o mesmo não acontece em indivíduos com pulmão saudável, pelo que uma amostra de lavado bronco-alveolar de apenas uma área pulmonar seria aceitável (21). Posteriormente, o mesmo grupo validou a utilização de amostras colhidas através de broncofibroscopia como método de estudo do microbioma pulmonar (22).

### 1.1.5 Viroma pulmonar

O viroma pulmonar humano compreende todos os vírus que se encontram nas vias aéreas inferiores e no pulmão. Existem poucos estudos disponíveis na literatura científica sobre a caracterização do viroma do aparelho respiratório, sobretudo das vias aéreas inferiores (5). Ao contrário das outras superfícies mucosas, facilmente acessíveis e que contêm elevadas cargas microbianas, a colheita de amostras do aparelho respiratório inferior é feita através de métodos invasivos como foi atrás explicado.

Os estudos existentes mostram a presença de vírus residentes nos pulmões saudáveis e patológicos, sobretudo bacteriófagos. A doença pulmonar crónica e a imunossupressão influenciam as espécies de vírus detectadas e a carga viral. No contexto de infecção aguda poderá haver predomínio de determinada espécie viral. No entanto, podem ser detectadas em simultâneo outras espécies habitualmente patogénicas, levantando a questão de se estas serão sempre patogénicas quando presentes no tracto respiratório.

O primeiro estudo realizado com o objectivo de caracterizar o viroma respiratório através de abordagem metagenómica foi desenvolvido em 2009, nos Estados Unidos da América (EUA) (23), a partir de cinco amostras de expectoração de adultos com fibrose quística e cinco amostras de adultos saudáveis. Os resultados sugeriram haver um *core* de fagos no aparelho respiratório e um grupo adicional de fagos nos indivíduos com fibrose quística, associados a bactérias patogénicas. As comunidades de fagos nos indivíduos saudáveis pareciam ser transitórias e representativas do ambiente externo, enquanto nos indivíduos com fibrose quística a comunidade de fagos era representativa do ambiente interno, determinada pelas bactérias presentes. A limitação deste estudo é o facto de a expectoração poder não ser completamente representativa do aparelho respiratório inferior.

Em 2012, o grupo de Willner *et al* (24), avaliou a distribuição espacial da população viral em tecido de um par de pulmões explantados e um par de pulmões *post-mortem* de adultos com fibrose quística grave, através de análise metagenómica. Verificaram que entre 36 e 88% das sequências virais, após comparação com o depósito de sequências virais do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), eram desconhecidas. Foram identificados fagos associados a bactérias habitualmente presentes nestes

doentes, como *Pseudomonas aeruginosa* e vírus eucarióticos como Herpesvírus humano, Adenovírus, Papilomavírus humano e Torque teno vírus. Apesar de o número de amostras ser muito limitado verificou-se haver uma grande diversidade de vírus com distribuição heterogénea, nos diferentes lobos pulmonares. Os pulmões explantados tinham menor diversidade viral nos lobos apicais, onde existiam alterações patológicas mais exuberantes. Outra das limitações deste estudo foi o facto de apenas ter caracterizado vírus de DNA.

No mesmo ano, na Suécia, Lysholm *et al* (25), fizeram um estudo em indivíduos adultos com infecção respiratória das vias aéreas inferiores com o intuito de avaliar o viroma. Foram colhidos aspirados nasofaríngeos de 210 doentes, tendo sido identificadas 39 espécies, utilizando análise metagenómica. As três famílias mais prevalentes foram *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Picornaviridae*.

Outro grupo americano, Wylie *et al*, caracterizou os vírus presentes no exsudado da mucosa nasal de 176 crianças, entre os 2 e os 36 meses, subdivididas em dois grupos, saudáveis e com febre de etiologia não esclarecida, tendo o último grupo uma maior variedade de vírus, como seria esperado (26). No entanto, no grupo de crianças saudáveis, parecia haver um viroma residente, que se teria estabelecido nas vias aéreas, nos primeiros dois anos de vida. Contudo, o facto de a sua estabilidade ser duvidosa limita a extrapolação destes dados para a população adulta. No caso do microbioma intestinal, a estabilização parece ocorrer mais tarde, por volta dos 3 a 5 anos (27).

Recentemente, na China, o grupo de Wang *et al* (28), estudou amostras colhidas com zaragatoa nasofaríngea de 135 crianças com infecção respiratória grave e 15 crianças saudáveis, utilizando análise metagenómica. Foi identificada uma maior diversidade de vírus nas crianças doentes, incluindo vírus das famílias *Adenoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Coronaviridae*, *Parvoviridae* e *Anelloviridae*. As crianças saudáveis tinham menor diversidade de vírus, sendo que a maioria dos *reads* obtidos eram da família *Anelloviridae* e de bacteriófagos.

Em 2017, o mesmo grupo analisou 50 amostras colhidas com zaragatoa nasofaríngea a crianças com pneumonia adquirida na comunidade, mas sem agente etiológico identificado por PCR com pesquisa de 18 vírus respiratórios comuns. As amostras

foram submetidas a análise metagenómica, tendo sido identificados agentes de quatro famílias, *Paramyxoviridae*, *Herpesviridae*, *Anelloviridae* e *Polyomaviridae*. Foi detectado um novo Vírus parainfluenza tipo 3, VPI-3, com uma inserção no gene da hemaglutinina-neuraminidase que inviabilizou a sua detecção por PCR (29).

**Tabela 1** – Estudos de análise metagenómica do viroma respiratório (*adaptado de Mitchell B, 2016*) (3).

Autor (ano)	População	n	Amostra	Resultado
Willner (2009) (23)	FQ e saudáveis	10	Expectoração	Core de fagos adicional na FQ
Willner (2012) (24)	FQ	2	Tecido pulmonar	Diferentes padrões virais no pulmão
Lysholm (2012) (25)	IRB	210	Aspirado NF	Detecção de 39 espécies virais
Wylie (2012) (26)	Febre e saudáveis	176	Exsudado nasal	Mais <i>reads</i> virais nos doentes febris
Wang (2016) (28)	IRB e saudáveis	150	Zaragatoa NF	Maior diversidade viral na IRB
Xu (2017) (29)	IRB	50	Zaragatoa NF	Detecção de novos vírus

FQ – fibrose quística; IRB – infecção respiratória baixa; NF – nasofaríngeo

Tal como já foi referido anteriormente, até à data, o número de estudos disponíveis sobre o viroma pulmonar é escasso. O seu impacto é limitado pelo facto de incluírem um reduzido número de amostras, a maioria ser realizada em doentes pediátricos, não permitindo uma extrapolação fidedigna para a população adulta, a ausência de controlos e a exclusão da análise de vírus de RNA em vários estudos (3). Para além de todos estes factores, salienta-se que a maioria dos estudos referidos inclui amostras do aparelho respiratório superior devido a maior acessibilidade da colheita, assumindo-se que os resultados obtidos poderiam traduzir o que se passava nas vias aéreas inferiores. Contudo, trata-se de uma visão redutora, uma vez que o microbioma dos dois ambientes e o tropismo dos vírus respiratórios para os mesmos parecem ser diferentes. São ainda necessários estudos que caracterizem o viroma saudável, em crianças e adultos, que permitam a percepção das alterações que surgem na doença e de que forma este conhecimento pode influenciar a abordagem e tratamento dos doentes com infecção viral das vias respiratórias inferiores.

## 1.2 Infecções respiratórias virais

Os vírus são causa major de infecção do tracto respiratório, superior e inferior. O envolvimento do tracto respiratório inferior, na forma de traqueobronquite aguda ou pneumonia tem um impacto significativo na sociedade, o que está relacionado com a morbilidade e mortalidade associadas.

A pneumonia pode ser classificada quanto ao local onde foi adquirido o seu agente etiológico. Assim, a pneumonia adquirida na comunidade (PAC) define-se como uma infecção que surge fora do ambiente hospitalar ou menos de 48 horas após o internamento, num doente que não estava hospitalizado nem residia em lar ou instituição equivalente (30). A pneumonia nosocomial define-se como a infecção que surge num doente internado durante dois ou mais dias nos três meses precedentes, num doente que residia num lar ou instituição equivalente, que recebeu antibioterapia endovenosa, quimioterapia, cuidados relacionados com o tratamento de uma ferida ou hemodiálise nos 30 dias anteriores à infecção (31, 32). A pneumonia associada ao ventilador surge após 48 horas de ventilação mecânica invasiva (VMI).

A pneumonia é a principal causa infecciosa de hospitalização e mortalidade em adultos nos EUA, com os custos inerentes que lhe são atribuídos. A pneumonia de etiologia viral tem uma incidência anual de 200 milhões de casos sendo que, nos adultos, cerca de um terço dos casos de PAC é causada por vírus (33). Anualmente, cerca de 29 a 59 milhões de norte-americanos tem infecção por vírus Influenza, dos quais mais de 200.000 requerem internamento hospitalar e, aproximadamente 36.000, falecem (34). Cerca de 500 milhões de norte-americanos têm duas a três infecções respiratórias por vírus não Influenza, anualmente (35). Contudo, mais recentemente, em 2015 foi publicada uma metanálise por Wu *et al* (36), com base em 23 estudos de incidência da etiologia viral na PAC, detectada por PCR, em 6.404 adultos, estimando-se uma incidência combinada de 22.4%, sendo que os três agentes mais frequentemente envolvidos eram o vírus Influenza, Rinovírus humano e Coronavírus humano.

Em Portugal verificou-se um aumento do número de internamentos hospitalares por PAC, entre os períodos de 2000 a 2004 e de 2005 a 2009, estimado em 27.3% (37). Segundo números da Direcção Geral da Saúde (DGS) que remontam a 2014, foram

registados 60.486 internamentos por pneumonia bacteriana, com 26% de letalidade. A pneumonia viral foi responsável por 574 internamentos no mesmo ano, com letalidade que variou entre 2.9% (Norte) e 6.3% (Lisboa e Vale do Tejo) (38).

A infecção viral das vias respiratórias inferiores é comum em todos os grupos etários, embora seja uma entidade habitualmente associada à infância. No entanto, tem-se verificado que é também causa significativa de PAC e pneumonia nosocomial no adulto. Até à data, foram identificados pelo menos 26 vírus (tabela 2) que se associam a PAC, em crianças e adultos (33).

A maioria das infecções tem gravidade ligeira, ocorrendo os casos mais graves em crianças, idosos e indivíduos com comorbilidades crónicas como a doença pulmonar crónica obstrutiva, a Diabetes tipo 2, a doença cardíaca, hepática e renal crónica, a presença de neoplasia, etanolismo, desnutrição calórico-proteica e esplenectomia (remoção cirúrgica do baço). Os imunodeprimidos têm prevalência de infecção respiratória viral semelhante à dos imunocompetentes. Contudo, estes indivíduos apresentam factores de gravidade, como infecção mais prolongada, atingimento habitual do aparelho respiratório inferior e mortalidade mais elevada.

**Tabela 2** - Vírus respiratórios que causam PAC (*adaptado de Ruuskanen O, 2011*) (33).

Adenovírus humano	Enterovírus humano	Citomegalovírus
Vírus Influenza A, B e C	Coronavírus humano 229E, OC43, NL63, HKU1, SARS, MERS	Herpesvírus humano 6 e 7
Vírus Parainfluenza 1, 2, 3 e 4	Bocavírus humano	Parecovírus
Vírus sincicial respiratório	Vírus herpes simples	Vírus do Sarampo
Metapneumovírus humano	Vírus varicela-zoster	Mimivírus
Rinovírus humano	Vírus Epstein-Barr	Hantavírus

Em 2015 foi realizado o estudo EPIC (39), que envolveu 2.488 doentes internados com PAC. O agente causal foi identificado em apenas 38% dos doentes, sendo que os vírus estavam presentes em 27% do total de doentes e as bactérias em 14%. O Rinovírus humano e o Vírus Influenza foram os principais vírus presentes nas amostras analisadas.

Numa revisão de 10 estudos (33) envolvendo 2.910 casos de PAC em adultos, verificou-se que 22% tiveram teste de PCR positivo para vírus respiratórios. A prevalência de Vírus Influenza foi de 8%, seguindo-se o Vírus sincicial respiratório, 3%, o Vírus Parainfluenza humano e o Adenovírus humano, ambos em 2% do total de doentes. A utilização da PCR aumentou o nível de detecção viral, cuja identificação é mais difícil através de métodos convencionais, nomeadamente Rinovírus humano, Coronavírus humano e Metapneumovírus humano. Desta forma, torna-se perceptível o facto de a prevalência global da infecção respiratória viral ser mais elevada, cerca de 15 a 56%, nos estudos que utilizam métodos moleculares como a PCR.

O Vírus sincicial respiratório tem sido identificado com maior frequência na população adulta. Cerca de 2 a 9% dos idosos admitidos por pneumonia nos EUA tem infecção por este agente (40), o que se associa a mortalidade significativa. O Adenovírus tem sido implicado como causa de 90% das admissões hospitalares por pneumonia em militares americanos, com identificação de surtos (33). O Coronavírus humano tem sido detectado em 2 a 6% das amostras de adultos com pneumonia. Nos adultos admitidos por infecção respiratória por Metapneumovírus humano, a taxa de mortalidade foi de 7%. O Bocavírus humano é uma causa pouco frequente de pneumonia nos adultos.

Em 2018 foi publicado o primeiro estudo português (41) em que se analisou a etiologia de 188 episódios de infecção respiratória em 163 idosos residentes em lar, através de pesquisa por PCR. Os principais vírus encontrados foram Rinovírus humano (n = 53), Influenza A(H3) (n = 19) e Bocavírus humano (n = 14).

Os vírus têm também sido associados a doenças inflamatórias crónicas do pulmão, nomeadamente a asma, doença pulmonar crónica obstrutiva e fibrose quística. A informação sobre as alterações quantitativas e qualitativas do viroma pulmonar pode ser relevante para a percepção da progressão da doença pulmonar crónica e as suas exacerbações.

Outro problema relevante é a co-infecção pulmonar entre vírus e bactérias. Na pandemia por Vírus Influenza em 2009, causada pela variante H1N1pdm09, verificou-se a presença de co-infecção por bactérias, em cerca de 18 a 34% dos doentes internados em Unidade de Cuidados Intensivos (UCI), com uma taxa de mortalidade de

55% (42). Os principais agentes bacterianos foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*. Martin-Loeches *et al*, realizou um estudo com o objectivo de determinar a taxa de co-infecção em doentes críticos com gripe internados em 148 UCI's espanholas, ao longo de sete anos. De um total de 2.901 doentes, 16.6% tinha co-infecção, sendo que este foi um factor de risco independente para a mortalidade (43).

### 1.3 Principais vírus respiratórios

#### 1.3.1 *Adenoviridae*: Adenovírus humano

A família *Adenoviridae* é constituída por cinco géneros, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Ichadenovirus*, *Siadenovirus* e *Mastadenovirus*, o último é o único que causa infecção no Homem. Foi inicialmente identificada em 1953, no tecido linfóide das amígdalas e adenóides de crianças, o que levou à sua denominação (44). Existem mais de 70 serotipos humanos, que se classificam em sete subgrupos (A a G) (45).

Os Adenovírus são vírus de DNA de cadeia dupla, com 70 a 90 nm, sem invólucro (tabela 3). Têm elevada resistência, o que permite a sua sobrevivência prolongada em superfícies ambientais. Trata-se de uma família de vírus ubíquos, cuja transmissão ocorre ao longo de todos os meses do ano, embora possam ocorrer epidemias nalguns grupos específicos, como indivíduos frequentadores de centros de dia e recrutas militares, nos EUA. Em 2007 houve um surto de doença respiratória aguda causada por Adenovírus em quatro estados dos EUA, atribuído ao serotipo 14 (46).

A transmissão pode ocorrer por via respiratória, via fecal-oral, inoculação directa da conjuntiva ocular e contacto com superfícies inertes contaminadas. O local de entrada do vírus no organismo determina o local de infecção.

As manifestações clínicas variam de acordo com a idade e o estado imunitário do indivíduo. A maioria das infecções é assintomática. Na população pediátrica é uma causa importante de febre isolada, surgindo em 5 a 10% destes casos (47). Os síndromes major são a doença respiratória aguda, a febre faringo-conjuntival, a querato-conjuntivite epidémica, a cistite hemorrágica aguda e a gastroenterite.



**Tabela 3** - Características gerais dos vírus respiratórios (*adaptado de* Hodinka RL, 2016) (48).

Vírus	Tamanho (nm)	Genoma	Invólucro	Tipos	População alvo	Sazonalidade*	Síndromes
<b>Adenovírus</b>	70-90	DNA	Não	7 subgrupos (A-G); > 50 serotipos	Todos os grupos etários	Todo o ano	D. respiratória aguda Febre faringo-conjuntival Querato-conjuntivite epidêmica Cistite hemorrágica aguda Gastroenterite
<b>Influenza</b>	80-120	RNA segmentado ss (-)	Sim	3 tipos (A, B, C); A (3 subtipos HA e 2 NA)	Todos os grupos etários	Inverno (Dez-Fev)	Gripe
<b>Parainfluenza</b>	120-180	RNA linear ss (-)	Sim	4 serotipos (1, 2, 3, 4); subtipos 4A e 4B	VPI 1/2: 6 meses-12 anos; VPI 3: < 1 ano VPI 4: seropositividade ~ 100% > 10 anos	VPI 1: Outono; VPI 2: Outono (< que 1 e 3) VPI 3: Primavera/início Verão VPI 4: não tem	VPI 1: laringotraqueo-bronquite ( <i>croup</i> ) VPI 2: <i>croup</i> /IRB VPI 3: bronquite, bronquiolite, pneumonia VPI 4: infecção respiratória ligeira-grave (causa pouco frequente)
<b>Vírus sincicial respiratório</b>	120-200	RNA linear ss (-)	Sim	Subgrupos A e B; 10 genótipos A; 14 genótipos B	< 5 anos; idosos	Outono e Inverno	Bronquiolite Pneumonia
<b>Meta-pneumovírus</b>	120-180	RNA linear ss (-)	Sim	Subtipos A e B; subgrupos A1/A2 e B1/B2	< 5 anos; idosos	Inverno e Primavera	Bronquiolite Pneumonia
<b>Coronavírus</b>	80-160	RNA linear ss (+)	Sim	6 genótipos	Todos os grupos etários	Inverno e Primavera	10-30% constipações; exacerbação asma
<b>Rinovírus</b>	20-27	RNA linear ss (+)	Não	>100	Todos os grupos etários	Todo o ano, picos no Outono e Primavera	Constipação
<b>Enterovírus</b>	30	RNA linear ss (+)	Não	4 grupos A-D	Todos	Verão e Outono	S. febril Meningite
<b>Bocavírus</b>	18-26	DNA ss	Não	4 serotipos, 1-4	Crianças 6-24 meses	Inverno e Primavera	Infecção respiratória Gastroenterite aguda

\*climas temperados; ss - *single strand*; ds - *double strand*; HA – hemaglutinina; NA – neuraminidase; VPI – Vírus parainfluenza; IRB – infecção respiratória baixa

A doença respiratória aguda é mais frequente nos meses do inverno e primavera, causada por serotipos dos grupos B, C e E (49). Ocorre sobretudo nas crianças, caracterizando-se por faringite, coriza, otite média, traqueobronquite, bronquiolite e pneumonia. A pneumonia associa-se a infecção pelos serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14, 21 e 35, sendo a sobreinfecção bacteriana comum (50). Pode haver envolvimento extra-pulmonar, como meningo-encefalite, miocardite e hepatite. A doença grave associa-se aos serotipos 5, 7, 14 e 21.

O diagnóstico faz-se por cultura celular, detecção de antígenos e PCR. As amostras clínicas adequadas incluem zaragatoa ou aspirado nasofaríngeo ou orofaríngeo, expectoração, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar, zaragatoa conjuntival, fezes, urina, sangue, líquido e biópsia de tecidos. Todos os serotipos, com excepção do 40 e 41, causam alterações citopáticas características em cultura com linhagens celulares epiteliais humanas e de rim embrionário humano. A detecção de antígenos por ensaio imunoenzimático ou imunofluorescência é rápida, mas tem menor sensibilidade do que o exame cultural, no caso dos indivíduos imunocomprometidos. Contudo, é o método de eleição para a pesquisa dos serotipos 40 e 41, em amostras de fezes. A PCR é particularmente útil no diagnóstico de vírus de locais habitualmente estéreis, como o sangue, o líquido e tecidos. No caso de amostras respiratórias ou fecais, a sua detecção pode traduzir apenas contaminação.

Os testes serológicos permitem estabelecer o diagnóstico de forma retrospectiva. A maioria das crianças, por volta dos 10 anos, tem evidência serológica de infecção prévia.

O tratamento é essencialmente de suporte, uma vez que a maioria das infecções é auto-limitada. Nos casos envolvendo indivíduos imunocomprometidos, como os recém-nascidos e os transplantados, ou quando a infecção é grave, pode estar indicada a terapêutica anti-viral com cidofovir e a administração de imunoglobulina humana (51), embora não existam ensaios clínicos disponíveis.

A vacinação tem sido utilizada apenas em militares nos EUA, tendo sido constatada redução da incidência de infecção respiratória por este agente após a introdução de vacina anti-serotipos 4 e 7, em 1971 e, novamente, em 2011. No intervalo de 12 anos em que a vacinação foi suspensa nesta população, foi notória a re-emergência de surtos,

incluindo casos fatais (52).

O controlo da infecção requer a descontaminação das superfícies ambientais com agentes como o formaldeído, cloro e calor.

### **1.3.2 *Orthomyxoviridae*: Vírus Influenza**

Os vírus da família *Orthomyxoviridae* causam uma das infecções virais mais prevalentes e com maior impacto na saúde humana, à escala mundial, a gripe.

Existem três tipos de vírus Influenza, A, B e C, sendo que os dois primeiros têm maior relevância clínica no Homem. No caso do vírus Influenza A, o hospedeiro natural são as aves aquáticas migratórias, assim como outros vertebrados, incluindo o Homem. Este é o único hospedeiro do Vírus Influenza B.

Tratam-se de vírus de RNA de cadeia simples, com genoma de 80 a 120 nm, segmentado, característica que propicia o aparecimento de novas estirpes, a partir do rearranjo dos segmentos genéticos (tabela 3). Os vírus dos tipos A e B possuem no seu invólucro duas glicoproteínas imunogénicas, a hemaglutinina e a neuraminidase. O vírus Influenza A que circula na espécie humana possui um dos três subtipos major de hemaglutinina, H1, H2 e H3, e um dos dois subtipos de neuraminidase, N1 e N2. A hemaglutinina promove a entrada do vírus nas células do hospedeiro e a neuraminidase facilita a disseminação dos viriões recém-formados, a partir da superfície da célula do hospedeiro. O vírus Influenza tem tropismo pelas células epiteliais do aparelho respiratório superior e inferior.

A variação antigénica dos vírus Influenza ocorre de duas formas, conhecidas como “*drift*” e “*shift*” (53). O “*drift*” é um fenómeno lento e cumulativo, que surge nos tipos A e B, resultando da acumulação de mutações, devido à ausência de *proof-reading* da RNA polimerase. Origina as epidemias sazonais, que surgem anualmente, no Inverno, entre o final de Dezembro e o início de Março, em climas temperados. O “*shift*” resulta da redistribuição de segmentos do genoma, após infecção simultânea por estirpes “aviárias” e “humanas” em células de certos hospedeiros, como os suínos, ocorrendo de forma repentina e levando a alteração de subtipo, originando as pandemias.

Apesar de haver descrições de epidemias atribuídas ao vírus Influenza na antiguidade, este foi isolado no Homem apenas em 1933 (54). Até à presente data, a pandemia com maior impacto mundial foi a Gripe espanhola, causada pelo subtipo H1N1, entre 1918 e 1919. Foi responsável pela morte de 20 a 40 milhões de indivíduos, sobretudo na faixa etária entre os 15 e os 35 anos, um valor superior ao número de mortes ocorridas na 1ª Guerra Mundial, que antecedeu a pandemia. Outras pandemias se seguiram no século XX, nomeadamente a Gripe asiática, em 1957, causada pelo subtipo H2N2, que causou cerca de 1 a 2 milhões de mortos e a Gripe de Hong-Kong, em 1968, causada pelo subtipo H3N2, responsável pelo falecimento de 1 milhão de indivíduos. No século XXI, surgiu a primeira pandemia, em 2009, causada pela variante H1N1pdm09, embora a uma escala menor em comparação com as anteriores. Este subtipo resultou de um extenso fenómeno de redistribuição, a partir de vírus de origem humana, aviária e suína. Na pandemia de 2009, registou-se co-infecção bacteriana, sobretudo por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*, em cerca de 18 a 34% dos doentes internados em UCI (42).

Anualmente, cerca de 20% da população mundial é infectada pelo vírus Influenza, em epidemias sazonais, resultando em morbidade e mortalidade significativas.

Os indivíduos infectados têm uma elevada contagiosidade, possuindo elevada carga viral nas secreções respiratórias, sendo o vírus transmitido através de estornutos e da tosse. Contudo, a transmissão do vírus pode iniciar-se até um dia antes do início dos sintomas. O contacto directo com animais infectados e superfícies contaminadas também permite a sua transmissão. O período de incubação é de 1 a 4 dias. A duração média da transmissibilidade do vírus em indivíduos imunocompetentes é de 5 dias, embora possa ser mais prolongada em idosos e doentes com comorbilidades.

A gripe, a manifestação clássica deste vírus, é uma infecção respiratória aguda habitualmente auto-limitada. Apresenta sintomas sistémicos com início súbito, nomeadamente febre, mal-estar geral, cefaleia e mialgias e sintomas respiratórios, como tosse seca, odinofagia e rinorreia. Pode ter manifestações mais graves em indivíduos susceptíveis, das quais a mais frequente é a pneumonia, de etiologia viral primária ou bacteriana secundária, mais frequentemente pelas bactérias *Streptococcus pneumoniae*,

*Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus*, podendo haver progressão para ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*). As manifestações extra-pulmonares podem ocorrer, nomeadamente envolvimento do sistema nervoso central e periférico, cardíaco e músculo-esquelético (55).

A cultura celular a partir de amostras de aspirado nasal, zaragatoa orofaríngea, expectoração e lavado bronco-alveolar é o método de diagnóstico *gold-standard*, embora seja morosa, com aparecimento do efeito citopático característico após 48 a 72 horas. Desta forma, não é útil para o diagnóstico clínico. Os testes serológicos também não têm utilidade para o diagnóstico na fase aguda da doença, apenas de forma retrospectiva. Os testes de identificação de antigénios dos tipos A e B do vírus Influenza dão um resultado qualitativo em cerca de 15 minutos. Contudo, têm sensibilidade reduzida, de 62.3%, embora a especificidade seja elevada, 98.2% (56). A sensibilidade relaciona-se com a idade do doente, sendo superior nas crianças, com o tipo de vírus, sendo superior no vírus Influenza A e com a altura da colheita desde o início dos sintomas, sendo mais elevada nas primeiras 24 a 48 horas. A pesquisa de ácidos nucleicos é o método de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade, diferenciando os tipos e subtipos de Influenza.

Os inibidores da neuraminidase, oseltamivir e zanamivir estão indicados no tratamento da gripe nos casos com maior gravidade, ou seja, doentes com necessidade de internamento hospitalar ou com envolvimento do aparelho respiratório inferior. Devem ser iniciados o mais precocemente possível, uma vez que o benefício é máximo quando estes fármacos são iniciados nas primeiras 48 horas. O peramivir tem mecanismo de acção semelhante aos anteriores, estando indicado na ausência de possibilidade de administração dos mesmos.

O CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), em colaboração com a WHO (*World Health Organization*), monitoriza a actividade da doença no mundo, através do registo dos isolados, de forma a prever os componentes apropriados da vacina anual. Esta é uma vacina trivalente, contendo estirpes de H1N1 e H3N2 e uma estirpe de Influenza B (57).

Em Portugal, existe o Programa Nacional de Vigilância da Gripe (PNVG), resultante da

colaboração entre o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e a DGS, de acordo com normas do ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*), em parceria com o *World Health Organization Regional Office for Europe*. O PNVG integra várias redes, nomeadamente a Rede Médicos Sentinela, a Rede de Serviços de Urgência, a Rede de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe, a Rede de Serviços de Obstetrícia e a Rede de Cuidados Intensivos. Entre Outubro e Maio é elaborado um Boletim de Vigilância Epidemiológica da Gripe, com periodicidade semanal.

### **1.3.3 *Paramyxoviridae*: Vírus Parainfluenza humano, Vírus sincicial respiratório, Metapneumovírus humano**

A família *Paramyxoviridae* é constituída por vírus com genoma de RNA negativo, de cadeia simples, com invólucro. Divide-se em duas subfamílias, *Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae*, de acordo com a presença ou ausência de hemaglutinina e neuraminidase no invólucro, respectivamente. A subfamília *Paramyxovirinae* compreende o género *Respirovirus*, ao qual pertencem os Vírus Parainfluenza humanos, serotipos 1 e 3, e o género *Rubulavirus*, ao qual pertencem os Vírus Parainfluenza humanos, serotipos 2 e 4. A subfamília *Pneumovirinae* compreende o género *Pneumovirus* - Vírus sincicial respiratório e o género *Metapneumovirus* - Metapneumovírus humano.

#### **1.3.3.1 Vírus Parainfluenza humano**

Os Vírus Parainfluenzae (VPI) são patogéneos respiratórios comuns nos adultos e nas crianças. Embora sejam causa de morbilidade e mortalidade significativas nas crianças, o seu impacto nos adultos está ainda mal caracterizado, excepto nos indivíduos imunocomprometidos, nos quais podem causar doença grave (58).

Estes vírus, descobertos no final da década de 1950, compreendem quatro serotipos, VPI-1, VPI-2, VPI-3 e VPI-4 (tabela 3).

Os VPI são ubíquos e transmitem-se por contacto pessoa a pessoa e através de gotículas respiratórias. Nos EUA e, provavelmente noutros países temperados, cada serotipo tem um padrão sazonal característico. Enquanto o VPI-1 causa surtos bienais, no Outono, o

VPI-2 e o VPI-3 causam surtos anuais, no Outono e na Primavera, respectivamente.

De acordo com um estudo de prevalência realizado nos EUA entre 1990 e 2004, envolvendo 40.000 casos, o VPI-3 é o serotipo mais frequente nas crianças e nos adultos (52%), sendo que o VPI-1 (26%) e o VPI-2 (12%) são ambos mais frequentes nas crianças e o VPI-4 encontra-se em ambas as faixas etárias, embora a infecção por este agente seja rara (2%) (59). O VPI, em associação com o Vírus Influenza e o Vírus sincicial respiratório, é um dos agentes mais frequentes de infecção respiratória em adultos internados, com prevalência estimada de 2 a 15% (60). O VPI pode causar surtos de infecção nosocomial, com incidência de 15.6% num estudo realizado por Choi *et al*, que demonstrou que esta era a terceira causa de pneumonia nosocomial de etiologia viral, cuja primeira causa foi o Rinovírus humano (30.3%), seguida do Vírus Influenza (61).

O período de contagiosidade precede o início dos sintomas e pode até ocorrer na ausência destes. O envolvimento anatómico da infecção por VPI está limitado ao tracto respiratório, sobretudo o superior, embora possa ocorrer doença grave do tracto respiratório inferior; a extensão da infecção correlaciona-se com a gravidade da doença. O VPI-1 e o VPI-2 infectam a laringe e a traqueia proximal, enquanto o VPI-3 tem envolvimento preferencial das vias aéreas mais distais. Estes vírus não apresentam uma fase de virémia, isto é, doença sistémica. A infecção por VPI confere imunidade protectora de curta duração, pelo que a reinfeção é comum, embora de gravidade ligeira, sugerindo persistência de imunidade parcial.

As manifestações clínicas dependem do serotipo causador da infecção e do estado imunológico do indivíduo. Caracterizam-se por sintomas gripais, bronquite e laringite, podendo ser causa de pneumonia, sobretudo no idoso e nos doentes imunocomprometidos, por ordem crescente de gravidade: VPI-3, VPI-1 e VPI-2. Nos adultos imunocompetentes, as infecções por VPI são habitualmente assintomáticas ou de gravidade ligeira, auto-limitadas.

O diagnóstico é feito a partir de amostras respiratórias, nasais e brônquicas. A cultura celular é feita em células de rim de macaco verde, mas o resultado só é obtido após 5 a 14 dias, sendo a técnica de *Shell-vial* preferível, dado o encurtamento do tempo de resposta para cerca de 24 horas. A detecção de antígenos por imunofluorescência

directa ou indirecta tem sensibilidade limitada, de 70 a 90%, e especificidade de 94%. A PCR é a técnica de eleição, com sensibilidade de 100% e especificidade de 95 a 98%, em comparação com a cultura. A utilização de PCR *multiplex* para diagnóstico de agente em indivíduos com suspeita de pneumonia viral tem permitido um conhecimento mais fidedigno da sua real prevalência nestes casos.

Não existe tratamento específico aprovado. Nos indivíduos imunocomprometidos, tem sido utilizada a ribavirina, habitualmente associada a imunoglobulina, embora não esteja provado o seu benefício na redução da mortalidade. DAS 181, um novo agente antiviral inalado, com eficácia em modelos animais, tem sido estudado em indivíduos imunocomprometidos, aparentemente com resultados promissores (58). Até à data também não está licenciada nenhuma vacina para este agente.

#### **1.3.3.2 Vírus sincicial respiratório**

O Vírus sincicial respiratório (VSR) foi isolado, pela primeira vez, em 1956 (62). A sua denominação advém do seu efeito citopático característico, com formação de sincícios em culturas celulares. Classifica-se em dois grupos, A e B, de acordo com características genéticas (tabela 3). Inicialmente, foi descrito como sendo causa major de infecção respiratória na criança, mas, posteriormente, foi identificado como causa significativa de infecção em adultos, sobretudo idosos, embora nem sempre seja identificado.

O VSR é a causa mais comum de infecção das vias respiratórias inferiores nas crianças com idade inferior a um ano. Aos dois anos, quase todas as crianças terão sido infectadas por este agente e, embora a reinfeção seja comum, habitualmente tem menor gravidade. Contudo, verificam-se formas mais graves nos idosos, nos doentes imunocomprometidos e em indivíduos com patologia cardíaca e pulmonar crónicas.

Nos EUA, a incidência de infecção por este vírus nos idosos é de 2 a 10% (63). Estima-se que este vírus possa ser responsável por cerca de 25% do aumento da mortalidade verificada no Inverno, que inicialmente era apenas atribuída ao Vírus Influenza. Em Espanha, Kestler *et al*, analisaram a presença de VSR em adultos hospitalizados com síndrome gripal adquirido na comunidade ou no hospital, tendo identificado, numa



população de 1.200 doentes, 9% de indivíduos com Vírus Influenza e 8% com VSR. Comparando os dois grupos, o grupo de doentes com VSR tinha idade mais avançada, infecção habitualmente adquirida em meio hospitalar e mortalidade superior (64).

No hemisfério norte, o VSR circula entre os meses de Novembro e Abril, com pico em Janeiro ou Fevereiro. A transmissão faz-se por inoculação directa de gotículas respiratórias através da nasofaringe ou da mucosa ocular, após contacto com secreções ou superfícies ambientais contaminadas. O período de incubação é de 4 a 6 dias e a infecção respiratória inferior surge após 1 a 3 dias.

As manifestações clínicas dependem da idade do indivíduo, do estado de saúde do mesmo e se se trata de uma infecção primária ou secundária. Nas crianças abaixo de um ano é o principal causador de bronquiolite. Nas crianças mais velhas, os sintomas são semelhantes aos dos restantes vírus respiratórios, nomeadamente rinorreia, congestão nasal, odinofagia, tosse e dispneia. O atingimento do tracto respiratório inferior é comum e pode levar a insuficiência respiratória em 8 a 13% dos casos e morte em 2 a 5% dos doentes infectados (63).

O diagnóstico de infecção por VSR é feito através de detecção directa de antígenos, cultura celular e métodos moleculares. A detecção de antígenos por imunofluorescência ou métodos imunoenzimáticos é muito rápida, mas a sensibilidade é muito baixa nos idosos, entre zero e 23%. A cultura celular também tem sensibilidade baixa nesta população, 20 a 40%, devido à carga viral reduzida e termolabilidade do vírus. As técnicas moleculares, nomeadamente rtPCR (*reverse transcription – Polymerase chain reaction*), são o *gold standard* no diagnóstico de VSR, com sensibilidade estimada de 73% e especificidade de 99%. O diagnóstico serológico tem sensibilidade de 90 a 95% nos idosos, embora não tenha utilidade diagnóstica (65).

O tratamento é essencialmente de suporte, embora nos casos de infecção do tracto respiratório inferior nos adultos receptores de transplante de medula óssea haja benefício na administração precoce de ribavirina (66). A prevenção da transmissão consiste na lavagem frequente das mãos e desinfecção das superfícies ambientais.

### 1.3.3.3 Metapneumovírus humano

O Metapneumovírus humano (MPVh) foi identificado pela primeira vez, em 2001, por investigadores holandeses, em 28 crianças com clínica semelhante àquela causada pelo VSR (67). Posteriormente, constatou-se através de métodos serológicos que, afinal, este agente já seria causa de patologia pulmonar no Homem há cerca de seis décadas, com distribuição mundial. Duas razões para o atraso na identificação deste vírus são o facto de as manifestações clínicas serem semelhantes às de outros vírus respiratórios e ainda o seu crescimento em cultura ser lento e pouco eficiente.

O MPVh tem dois genótipos major, A e B, e cada um divide-se em dois subtipos, 1 e 2 (tabela 3).

A fisiopatologia da infecção está intimamente relacionada com a do VSR, membro da mesma subfamília, tendo ambos tropismo para o epitélio respiratório.

Trata-se de um vírus ubíquo que infecta indivíduos de todos os grupos etários, embora a doença sintomática seja mais frequente em crianças com menos de cinco anos e adultos com idade superior a 65 anos (68). Na idade pediátrica, é o segundo agente viral mais frequente de infecção respiratória com necessidade de hospitalização, a seguir ao VSR (69). A co-infecção por estes dois vírus é frequente, sendo que os meses de maior actividade de ambos são sobreponíveis. Por outro lado, a co-circulação dos paramixovírus poderá reduzir a incidência de infecção sintomática por MPVh, devido a imunidade protectora cruzada, transitória, induzida pelos vírus da mesma família (70). Nos climas temperados, a infecção por este agente é mais prevalente no final do Inverno e início da Primavera. Desconhece-se a existência de sazonalidade nos restantes climas, dada a ausência de dados na literatura.

A transmissão, aparentemente, ocorre por contacto directo ou próximo com secreções respiratórias contaminadas, tal como ocorre nos restantes vírus respiratórios. As infecções nosocomiais podem ocorrer tanto nas crianças como nos adultos internados. Em geral, as infecções respiratórias por MPVh são menos frequentes nos adultos do que nas crianças. Falsey *et al*, realizaram um estudo prospectivo em adultos norte-americanos, durante duas estações de Inverno, tendo identificado MPVh em 4.5% de um

total de 984 infecções respiratórias (71). No Canadá, Johnstone *et al*, realizaram outro estudo prospectivo com o objectivo de avaliar a etiologia da PAC em 300 doentes adultos, através de rtPCR de amostras de zaragatoa nasofaríngea. A prevalência foi semelhante, 4%, sendo que a idade média dos doentes infectados por MPVh foi de 62 anos e todos tinham doença cardíaca ou pulmonar crónica subjacente (72). Noutro trabalho realizado pela equipa de Falsey *et al*, constatou-se que o estado de portador assintomático de MPVh é muito raro, tendo sido analisadas amostras de secreções nasais (73).

Habitualmente, os indivíduos infectados têm manifestações clínicas com gravidade ligeira, atingindo apenas o tracto respiratório superior, de forma auto-limitada, após um período de incubação de cinco a seis dias. Contudo, o espectro de doença nos adultos pode variar entre infecção respiratória alta ligeira e pneumonia grave. Tal como outros vírus respiratórios, o MPVh pode ser factor de exacerbação de crises asmáticas.

O diagnóstico faz-se por rtPCR, o método mais sensível para a detecção deste vírus. O crescimento do MPVh em cultura celular é um processo muito lento e muitas vezes ineficiente, como já foi atrás referido, o que poderá ser obviado pela técnica de *Shell-vial*. Por outro lado, o método serológico permite o diagnóstico apenas de forma retrospectiva, interessante apenas em estudos epidemiológicos.

O tratamento é de suporte. A ribavirina, que apresenta actividade contra o VSR, parece também ser activa contra este agente, embora com eficácia comprovada apenas *in vitro* (74). As medidas de controlo da infecção são particularmente importantes em indivíduos institucionalizados e hospitalizados, consistindo nas precauções de contacto habituais e isolamento em quartos individuais ou agrupamentos de doentes infectados com o mesmo agente.

#### **1.3.4 *Coronaviridae*: Coronavírus humano**

A família *Coronaviridae* divide-se em quatro géneros (alfa, beta, gama e delta) sendo que os Coronavírus que infectam o Homem (CoVh) pertencem apenas aos dois primeiros: os alfa-coronavírus, CoVh-229E e CoVh-NL63, e os beta-coronavírus, CoVh-HKU1, CoVh-OC43, CoVh-SARS (*Severe acute respiratory syndrome*) e CoVh-

MERS (*Middle East respiratory syndrome*), segundo a classificação do ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*, acedido em 28 de Junho de 2018.

Os CoVh são vírus com genoma de RNA de cadeia simples, com invólucro (tabela 3), em cuja superfície se projectam glicoproteínas, formando uma coroa visível em microscopia eletrónica, daí, a sua denominação.

Os primeiros CoVh a ser descritos foram CoVh-229E e CoVh-OC43, na década de 1960, através de cultura celular (75, 76). Em 2002, no sul da China, foi detectado um novo agente responsável por SARS, identificado como CoVh-SARS. Rapidamente, este agente disseminou-se através de viajantes para Hong-Kong e, daí, para o Vietnam, Toronto e outros locais do mundo. No total, foram infectados mais de 8.000 indivíduos neste surto, dos quais 774 faleceram (33, 77). Em 2004 e 2005 foram identificados CoVh endémicos, CoVh-NL63 (78) e CoVh-HKU-1 (79), respectivamente, através de métodos moleculares, tal como o agente anterior. Finalmente, o CoVh-MERS, foi identificado num surto na Arábia Saudita em 2012 (80) e, subsequentemente, noutros países asiáticos como a Coreia, os Emiratos Árabes Unidos e o Irão. Foram descritos casos importados em países de África, Europa e nos EUA.

Os CoVh são vírus ubíquos nos humanos, que se transmitem através de aerossóis e gotículas com tamanho superior a 5 µm, embora possam também estar presentes no suor, urina e fezes. As infecções pelas estirpes CoVh-SARS e CoVh-MERS são zoonoses, parecendo ter o seu reservatório em morcegos e, no caso do CoVh-MERS, também em dromedários (81). Nos climas temperados os CoVh surgem esporadicamente ou em surtos no Inverno e na Primavera. Nos surtos, é habitual haver predomínio de uma estirpe.

Apesar da presença de anticorpos para este vírus, as reinfecções são comuns, o que está relacionado com a perda gradual de imunidade e com a variação antigénica das estirpes.

A manifestação clínica mais frequente dos CoVh endémicos é a coriza, ou seja, a constipação comum, embora a infecção por CoVh possa estender-se às vias aéreas inferiores e causar quadros de pneumonia grave ou exacerbar doenças pulmonares crónicas, como a asma e a doença pulmonar crónica obstrutiva. A infecção por CoVh-SARS e CoVh-MERS origina infecções graves, com mortalidade muito significativa, ao

contrário dos restantes CoVh.

Os CoVh crescem dificilmente em cultura celular (48). Assim, os métodos de detecção dos coronavírus são a pesquisa de antígenos por imunofluorescência, substituída pela rtPCR, a partir de amostras respiratórias e fezes. Apesar de ter sido desenvolvido um *primer pan-coronavírus*, os *primers* específicos de cada estirpe têm maior sensibilidade. O isolamento do vírus, nomeadamente o CoVh-SARS e o CoVh-MERS, requer laboratórios com nível de segurança 3 (*biosafety level*, BSL-3).

Não existe qualquer terapêutica nem vacina disponível, para além das medidas de controlo sintomático. Existem estudos experimentais *in vitro* e em modelos animais da ribavirina isolada ou em associação ao interferão, no caso das estirpes de CoVh-SARS e CoVh-MERS, embora a sua eficácia no Homem seja controversa (82, 83).

A melhor medida de prevenção é a lavagem frequente das mãos, uma vez que as soluções desinfetantes e anti-sépticas são ineficazes na eliminação do vírus. No caso do CoVh-MERS deverá ser evitado o contacto com animais doentes, assim como a ingestão de leite não pasteurizado de dromedário e de carne crua do mesmo.

Não existe vacina disponível para os CoVh, embora tenham sido previamente testadas várias abordagens no que diz respeito ao CoVh-SARS, sem sucesso, assim como, mais recentemente, para o CoVh-MERS (84).

### **1.3.5 Picornaviridae: Rinovírus humano e Enterovírus humano**

Segundo a classificação do ICTV, a família *Picornaviridae* compreende 80 espécies, agrupadas em 35 géneros, dos quais se salientam os Enterovírus, que incluem 13 espécies, Enterovírus humano A-J e Rinovírus humano A-C.

Os vírus desta família têm genoma de RNA de cadeia simples, sem invólucro, e caracterizam-se por apresentar pequenas dimensões, com um diâmetro de cerca de 30 nm (85).

### **1.3.5.1 Rinovírus humano**

O Rinovírus humano (RVh) tem cerca de 150 serotipos (86) (tabela 3) e, dado que a infecção induz uma resposta humoral com formação de anticorpos para o serotipo infectante, mas não para diferentes serotipos, compreende-se que seja causa frequente de infecção.

Trata-se de um vírus ubíquo, com incidência mais elevada na Primavera e no início do Outono, nos climas temperados, assim como nos climas subtropicais. O seu reservatório maior são as crianças. Após a infecção, o RVh permanece nas secreções nasais durante cinco a sete dias, podendo persistir na nasofaringe até duas a três semanas. Esta é o local primário de infecção que, na maioria dos casos, ocorre por auto-inoculação, embora também seja possível a transmissão através de aerossóis.

O RVh é um patogéneo primário do tracto respiratório, sendo detectado nas células epiteliais ciliadas da mucosa nasal e da nasofaringe, assim como no tracto respiratório inferior.

A maioria das infecções é assintomática, sobretudo nas crianças mais velhas e nos adultos. O RVh é a causa mais comum da constipação vulgar, que traduz uma miríade de sintomas, nomeadamente rinorreia, congestão nasal, odinofagia, tosse, cefaleia e mal-estar geral. Tipicamente, os sintomas resolvem em cinco a sete dias. Este agente tem sido negligenciado como causa de doença grave (85). Contudo, esta tendência tem vindo a ser contrariada, uma vez que tem-lhe sido atribuída a causalidade de PAC em adultos (87), infecção respiratória nosocomial (88), e exacerbação de asma e doença pulmonar crónica obstrutiva (85). Para além disto, o RVh também parece predispor para a pneumonia bacteriana secundária.

O diagnóstico faz-se por rtPCR, um método com sensibilidade muito superior à da cultura celular.

O tratamento é de suporte, embora possa haver algum benefício na administração de pleconaril, se o início da toma ocorrer nas primeiras 24 horas, verificando-se, nestes casos, redução da duração dos sintomas (84). Não está disponível uma vacina eficaz mas parece haver resultados promissores com uma vacina inactivada polivalente, com

50 serotipos, num estudo realizado em macacos Rhesus (89).

### 1.3.5.2 Enterovírus humano

A classificação tradicional dos Enterovírus (EVh) baseava-se nas manifestações clínicas e no padrão de lesão dos tecidos de modelos animais, dividindo-se entre poliovírus e “não-poliovírus”. Com o advento dos métodos moleculares os Enterovírus foram re-classificados em quatro grupos, A a D (tabelas 3 e 4).

**Tabela 4** - Classificação actual dos Enterovírus (*adaptado de <http://picornastudygroup.com/taxa/taxa.htm>*).

Classificação Tradicional		Nova Classificação
Grupos e serotipos	<b>Coxsackievirus A</b> 1-22, 24*	<b>Grupo A</b> Coxsackievirus A serotipos 2-8, 10, 12, 14, 16; Enterovirus serotipos 71, 76, 89-92
	<b>Coxsackievirus B</b> 1-6	<b>Grupo B</b> Coxsackievirus A serotipo 9; B serotipos 1-6 Echovirus serotipos 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33; Enterovirus serotipos 69, 73-75, 77-88, 93, 97, 98, 100, 101, 106, 107
	<b>Echovirus</b> 1-9, 11-27, 29-33	
	<b>Poliovirus</b> 1-3	<b>Grupo C</b> Poliovirus serotipos 1-3; Coxsackievirus A serotipos 1, 11, 13, 17, 19-22, 24
	<b>Enterovirus</b> 68-72	<b>Grupo D</b> Enterovirus D68, D70, D94, D111

\*Coxsackievirus 23 foi re-classificado como Echovirus 9

O Enterovírus transmite-se por via fecal-oral e através do aparelho respiratório, tendo um período de incubação de um a três dias. Após a infecção primária, o vírus permanece nas secreções respiratórias durante uma a três semanas e nas fezes durante duas a oito semanas. A via respiratória é o principal meio de transmissão dos serotipos Coxsackievirus A21 e Enterovirus D68.

Estes vírus têm distribuição mundial, verificando-se flutuações frequentes dos serotipos predominantes. O padrão de infecção é sazonal, surgindo sobretudo nas estações do

Verão e Outono, em climas temperados, com pico em Agosto. De acordo com dados do *National Enterovirus Surveillance System* do *Centers for Disease Control and Prevention*, a sazonalidade referida reporta-se, sobretudo, aos serotipos detectados em amostras de líquido (81.3%), em comparação com amostras de fezes (77.6%) e do tracto respiratório (69.8%) (90).

Cerca de 50% das infecções por Enterovírus são assintomáticas. A idade jovem é um factor de risco para a infecção sintomática, que se caracteriza por síndrome febril com duração de três dias ou com evolução bifásica, com recorrência da febre dois a três dias após as primeiras 24 horas. O envolvimento do sistema nervoso central manifesta-se por meningite, sendo que este é o agente mais comum desta síndrome, mais frequente nas crianças, mas podendo atingir a população adulta durante os surtos. Ainda dentro das manifestações neurológicas, a referir a encefalite (causa pouco comum) e a paralisia “não-polio”. As principais manifestações dos restantes órgãos e sistemas são a conjuntivite hemorrágica aguda, a herpangina, a faringite ganglionar aguda, o síndrome mão-pé-boca, miopericardite e pleurodinia. Recentemente, foi identificada uma associação entre o Enterovirus D68 e a exacerbação asmática ou hiperreactividade das vias aéreas em crianças (o que se pensa estar relacionado com a metodologia do estudo, realizado de forma retrospectiva, através da consulta de informação clínica, sobretudo em hospitais pediátricos) nos EUA, durante um surto em 2014 (91) e o Coxsackie A16 o eczema em crianças com dermatite atópica. O Enterovirus D68, inicialmente isolado em 1962, difere dos restantes do seu género pelo facto de ser identificado sobretudo em associação a patologia respiratória. Para além disto, tem semelhanças, do ponto de vista biológico, com o Rinovírus.

O diagnóstico faz-se por rtPCR, que apresenta sensibilidade superior à cultura (86% vs. 30%) em amostras de líquido e secreções respiratórias (90).

O tratamento é de suporte sintomático, não havendo tratamento específico, independentemente da gravidade da doença. A imunoglobulina poderá estar indicada nas infecções neonatais e em indivíduos imunossuprimidos. O pleconaril demonstrou redução do número de dias de doença no caso da meningite mas não na constipação comum (92). A prevenção da infecção faz-se através de medidas gerais como a lavagem



das mãos e higiene adequada na troca de fraldas.

### **1.3.6 *Parvoviridae*: Bocavírus humano**

O Bocavírus humano (BoVh) pertence ao género *Bocavirus* e à família *Parvoviridae*. Foi inicialmente identificado em 2005, por um grupo de cientistas sueco, como um vírus previamente não caracterizado, em amostras da nasofaringe de crianças com infecção respiratória aguda (93). Posteriormente, foram identificadas mais três estirpes, BoVh-2, BoVh-3 e BoVh-4, em amostras fecais. A estirpe inicialmente identificada, BoVh-1, encontra-se sobretudo em amostras respiratórias, ao contrário das últimas três, embora também possa ser encontrada no sangue periférico, o que sugere tratar-se de uma infecção sistémica.

O BoVh está relacionado com patógenos animais, nomeadamente o parvovírus bovino e o vírus canino, advindo o seu nome da combinação entre ambos. É um vírus de DNA de cadeia simples, sem invólucro (tabela 3).

A patogénese deste agente está ainda mal esclarecida (94), devido à ausência de modelos animais e culturas celulares eficazes disponíveis. O BoVh é habitualmente detectado na presença de outros vírus, o que levanta a hipótese de não se tratar de um patógeno primário. Foi detectada co-infecção em 83% de amostras respiratórias de doentes com pneumonia, na maioria dos casos com o RVh, mas também com o VSR e o PIV (95). Ghietto *et al*, encontraram associação mais frequente com o VSR, em 89.5% dos casos (96). Contudo, o grupo de Moesker *et al*, também em 2015, detectou a presença de BoVh através de metagenómica, em amostras respiratórias de crianças com infecção respiratória aguda grave, sendo que o BoVh era o único agente causal (97).

O BoVh-1 pode ser detectado em amostras da nasofaringe de crianças imunocompetentes durante seis meses após a infecção (98). Este genótipo é frequentemente detectado em associação com outros vírus em indivíduos assintomáticos, o que pode sugerir a reactivação de vírus latentes através de uma superinfecção (99).

O BoVh tem distribuição mundial, e a transmissão e a infecção ocorrem ao longo de

todo o ano mas, sobretudo, nos meses de Inverno e Primavera. Infecta indivíduos de todas as idades, predominantemente crianças entre os 6 e os 24 meses. Guido *et al*, estimaram uma prevalência global de 6.3% no tracto respiratório (variação entre 1% nas Filipinas e Senegal e 56.8% no Egipto), a partir da análise de 357 artigos publicados entre 6 de setembro de 2005 e 15 de março de 2016 (94). Em Portugal, esta análise foi feita a partir de três estudos envolvendo 428 indivíduos, com uma prevalência estimada de 6.5% (100, 101, 102). Chow *et al* (103) identificaram 1.5% de adultos hospitalizados com isolamento do vírus em amostras respiratórias através de PCR, sem etiologia viral alternativa. À excepção de dois doentes que tinham patologia cardíaca subjacente, todos os restantes tinham patologia pulmonar. Garbino *et al* (104), identificaram 3.1% de adultos com infecção do tracto respiratório inferior por BoVh.

O BoVh tem sido implicado na etiologia de infecção respiratória em adultos e gastroenterite aguda em adultos e crianças, embora não esteja ainda esclarecido o seu papel causal no tracto respiratório, apesar de estar relacionado com quadros de pneumonia atípica e de exacerbação de bronquite aguda.

O diagnóstico é feito por PCR a partir de amostras respiratórias, fecais e sangue periférico. O tratamento é de suporte.

#### **1.4 Diagnóstico dos vírus respiratórios**

O diagnóstico laboratorial de vírus no aparelho respiratório (tabelas 5 e 6) consiste no isolamento do vírus ou da detecção de antígenos virais através de cultura ou da microscopia de imunofluorescência/imunocromatografia, respectivamente, em amostras do tracto respiratório superior e inferior. O doseamento de anticorpos em amostras serológicas tem um papel limitado no diagnóstico clínico. A introdução dos métodos moleculares permitiu uma franca melhoria na detecção dos agentes virais, nomeadamente aqueles com crescimento deficitário em cultura.

**Tabela 5** - Métodos de diagnóstico de vírus respiratórios (*adaptado de* Hodinka RL, 2016) (48).

Métodos	Sensibilidade	Especificidade	Tempo	Utilidade clínica
<b>Cultura</b>				
.convencional	Ligeira-moderada	Elevada	3-14 dias	Crescimento de qualquer vírus; tempo, trabalho e recursos consideráveis
. <i>Shell-vial</i>	Ligeira-moderada	Elevada	1-3 dias	Vírus seleccionados, menor sensibilidade
<b>Deteção de antígenos</b>				
.imunofluorescência	Moderada	Moderada-elevada	1-2 horas	Rápida, deteção <i>multianalyte</i> ; leitura complexa e subjectiva
.imunoenzimáticos	Ligeira-moderada	Moderada-elevada	≤ 15 minutos	Rápida e simples
<b>Serologia</b>	Na	Na	Na	Investigação e estudos epidemiológicos; não é útil para diagnóstico;
<b>Amplificação de ácidos nucleicos</b>	Elevada	Elevada	15 minutos-8 horas	Nova referência padrão; <i>performance</i> elevada
<b>Metagenómica</b>	Elevada	Elevada		

Na – não aplicável

### 1.4.1 Cultura celular

A cultura convencional de células é o método clássico para o isolamento dos vírus, tendo sido considerada, durante várias décadas, o método *gold standard*. Este método requer vários passos até à recuperação viral, nomeadamente, a filtração da amostra para remoção de células do hospedeiro e outros agentes microbianos, a inoculação do filtrado em culturas celulares, a purificação dos vírus e a sua caracterização. A maioria dos vírus respiratórios leva ao aparecimento de efeito citopático, característico da espécie, em três a sete dias, mas pode demorar até 14 dias (48). As vantagens desta técnica são a identificação de novos vírus, inesperados, e a possibilidade de deteção de isolados clínicos para estudos epidemiológicos (105). Contudo, o facto de ser uma técnica morosa faz com que acabe por não ter impacto no diagnóstico clínico, o que constitui a sua grande desvantagem, para além de ser necessária experiência e a sensibilidade ser variável no caso dos vírus respiratórios, dado alguns destes não crescerem em cultura.

Actualmente, a cultura celular está limitada aos laboratórios de referência, com o objectivo maior de recuperação das estirpes virais para posterior caracterização genética e/ou antigénica para estudos de patogénese, testes fenotípicos de susceptibilidade a antivirais, investigação de vacinas e antivirais (106).

**Tabela 6** – Comparação dos métodos de identificação viral (*adaptado de Datta S, 2015*) (107).

	Cultura celular	PCR	Amplificação independente da sequência	Meta-sequenciação
Necessidade de cultura de células	Sim	Não	Não	Não
Informação sobre efeito citopático	Sim	Não	Não	Não
Equipamento para purificação viral	Sim (ultracentrifugação)	Não (obtenção de preparações semi-puras através de centrifugação a baixas velocidades)		
Informação das características morfológicas /estruturais	Sim	Não	Não	Não
Tempo até identificação viral	Dias a semanas	Alguns dias	Poucos dias	Horas a dias
Conhecimento prévio do vírus	Desnecessário	Sim (género/ família)	Desnecessário	Desnecessário
Espectro de detecção dinâmica	Muito estreito	Estreito	Largo	Muito largo
Tolerância a materiais não virais	Vulnerável a patogéneos infectantes de células	Menos vulnerável a sequências do hospedeiro e outros microorganismos	Mais vulnerável a outras sequências	Mais vulnerável a outras sequências
Descoberta de novos vírus	Sim	Apenas genótipos/ variantes de vírus conhecidos		
Aplicabilidade a surtos	Não (demorado)	Não (conhecimento prévio de informação)	Sim (necessidade considerável de tempo)	Sim (célere)

A cultura *Shell-vial* foi desenvolvida com o objectivo de reduzir o tempo e a dificuldade de isolamento de vírus. Baseia-se na utilização de centrifugação a baixa velocidade

como meio de facilitação da inoculação das culturas celulares com os vírus presentes nas amostras clínicas. O crescimento é detectado antes do aparecimento do efeito citopático, através de imunofluorescência com anticorpos monoclonais para proteínas virais específicas. Relativamente à cultura convencional, este método permite resultados mais céleres, em um a dois dias, mas apenas detecta os vírus que forem pesquisados. No caso dos vírus respiratórios, aplica-se ao Adenovírus, Influenza A e B, VPI 1 a 4, VSR e MPVh e pode levar até três a cinco dias para obtenção dos resultados.

#### **1.4.2 Detecção de antígenos**

Os métodos imunológicos de detecção de antígenos incluem os ensaios de imunofluorescência directa (IFD), os ensaios imunoenzimáticos (EIA) e os ensaios imunocromatográficos. Tratam-se de métodos de simples e rápida execução, pouco dispendiosos e que não necessitam do vírus viável para a sua detecção. A sensibilidade e especificidade são muito variáveis, sobretudo a primeira, dependendo da idade do doente, do vírus a ser detectado, do tipo de teste e da qualidade da amostra. As crianças habitualmente têm carga viral mais elevada e durante um período de tempo mais prolongado do que os adultos (108).

O primeiro tipo de ensaio, a IFD, utiliza um marcador com fluoresceína, sendo que o padrão de imunofluorescência e a localização da mesma nas células infectadas permite a identificação do vírus por microscopia de imunofluorescência. Nos EIA, o antígeno do vírus é capturado por anticorpos específicos e é detectado por um anticorpo ligado à enzima.

Estes testes são muito utilizados na prática clínica, dada a facilidade de execução da técnica e a rapidez de resultados, em minutos. Contudo, os ensaios imunocromatográficos apenas estão disponíveis para os vírus Influenza A e B, Adenovírus e VSR, enquanto os ensaios de IFD estão disponíveis para uma maior variedade de vírus respiratórios, com excepção de VPI-4, Bocavírus, Rinovírus e Coronavírus (105).

### 1.4.3 Serologia

A utilidade dos métodos serológicos para o diagnóstico clínico está limitada pela necessidade de colheita de sangue na fase aguda e posteriormente, na fase de convalescença. A seroconversão ou a elevação do título de imunoglobulina G em quatro vezes faz o diagnóstico do vírus responsável pela infecção mas com pouco impacto na abordagem clínica do doente. Os níveis de imunoglobulina M permitem a detecção da infecção na fase aguda, mas a sensibilidade é reduzida nos casos de exposição repetida à vacina ou ao vírus circulante.

### 1.4.4 Testes de amplificação de ácidos nucleicos

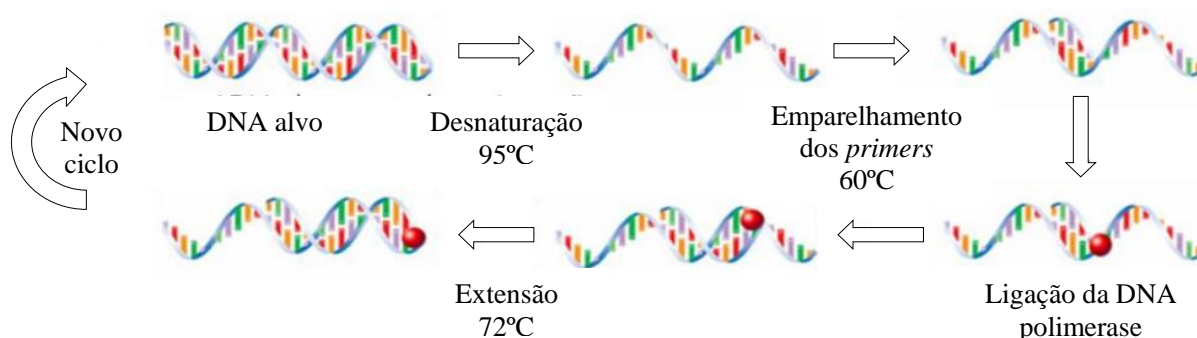
Os testes que se baseiam na detecção dos ácidos nucleicos, DNA e RNA, tiveram um grande impacto no diagnóstico virológico. De uma forma geral, os métodos moleculares, para além de céleres, têm cerca de duas a cinco vezes maior sensibilidade para a detecção de vírus respiratórios do que os métodos convencionais de diagnóstico, supracitados (33).

A PCR necessita de detecção após a amplificação do seu produto, através de electroforese (método convencional) ou com sondas específicas (PCR em tempo real, qPCR). A qPCR permite a realização simultânea da amplificação e da detecção, com um tempo de resposta de horas. Têm sido desenvolvidos protocolos de PCR em formato *multiplex*, resultando na identificação de vários vírus na mesma amostra respiratória. Desta forma, verificou-se um aumento significativo dos casos de infecção respiratória por mais do que um agente viral, embora possa tratar-se apenas de infecção por um agente e os restantes vírus serem *bystanders*. Para além disto, outra vantagem da qPCR é a quantificação dos ácidos nucleicos virais presentes numa determinada amostra respiratória, embora o seu valor seja ainda incerto.

Nas duas últimas décadas, o desenvolvimento destas técnicas permitiu a descoberta de vários genótipos de vírus conhecidos.

A PCR é um processo cíclico que consiste na repetição dos seguintes passos durante um determinado número de vezes (figura 3):

1. Desnaturação do DNA de dupla cadeia através de aquecimento a 95°C para obtenção de duas cadeias simples
2. Emparelhamento dos *primers* às zonas homólogas das cadeias simples de DNA, a uma temperatura próxima de 60°C, dependente da sua constituição nucleotídica
3. Ligação da DNA polimerase com produção de novas cadeias complementares, o que se denomina de extensão e ocorre a 72°C



**Figura 3** - Técnica de PCR

A *Taq polimerase* é uma enzima extraída da bactéria *Thermus aquaticus*. Trata-se de uma enzima termoestável que, *in vitro*, na presença de *primers*, copia uma determinada região da cadeia simples de DNA. Os *primers* são pequenos fragmentos iniciadores da nova cadeia, que hibridam em determinados locais específicos, delimitando o segmento a amplificar.

As sondas *Taqman* apresentam um fluoróforo numa extremidade e um *quencher* na outra. O *quencher* é uma molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e dissipa-a na forma de luz ou de calor. Os produtos da reacção são detectados pela fluorescência produzida após a actividade da exonuclease de 5' para 3' da *Taq polimerase*. Durante o procedimento de qPCR as sondas *Taqman* hibridam com a sequência da cadeia simples de DNA complementar alvo para a amplificação. Neste processo, a sonda *Taqman* é degradada, devido à actividade exonuclease 5' para 3' da *Taq polimerase*, o que resulta na separação do *quencher* da molécula fluorescente,

Durante a extensão. A separação entre o fluoróforo e o *quencher* resulta num aumento da intensidade da fluorescência. Durante o processo de amplificação, esta emissão de luz aumenta de forma exponencial e é detectada.

#### 1.4.5 Análise metagenómica

Em 1977, Sanger descreveu um método baseado na construção de bibliotecas de moléculas de DNA de cadeia simples, que diferiam entre si de um nucleótido, a partir de um extremo definido. A síntese das novas cadeias era feita a partir de um *primer* conhecido, com paragem da síntese com a incorporação de terminadores de cadeia, os dideoxirribonucleótidos, com suspensão da polimerização. Nas últimas três décadas, o método de Sanger foi considerado o *gold standard* de sequenciação do DNA.

A metagenómica, termo que remonta a 1998 (109), ou metasequenciação, refere-se a estudos independentes de cultura que permitem a identificação da totalidade do material genético directamente da amostra, constituída por comunidades microbianas mistas; não presume qualquer conhecimento acerca do organismo a ser investigado. Tem elevada sensibilidade e aplicações importantes na virologia, nomeadamente na análise de genomas completos, investigação de comunidades virais no ambiente e no corpo humano, em situações de homeostasia e doença, investigação da variabilidade do genoma viral no hospedeiro, denominada de *quasispecies*, detecção de mutações que conferem resistência a antivirais, entre outros (110). Desde que começou a ser aplicada no âmbito da virologia, tem permitido a descoberta de novos vírus em amostras clínicas, como o VPI-4, CoVh, BoVh, Torque Teno vírus, Poliomavírus e Herpesvírus humano tipos 6 e 8 (105).

O desenvolvimento das técnicas de sequenciação de DNA “*next generation*” *sequencing* (NGS) teve um grande avanço aquando o projecto de sequenciação do genoma humano, *Human Genome Project*, concluído em 2003 (7). Este tipo de técnica tem elevada produtividade, resultando num grande volume de sequências e de forma célere. A primeira plataforma foi desenvolvida em 2005 e, na última década, tem-se assistido a uma rápida expansão desta tecnologia. As plataformas de sequenciação mais recentes são denominadas de terceira geração, porque não há necessidade de interrupção do processamento de grandes moléculas de DNA entre os passos de leitura. A



sequenciação de milhões de fragmentos de DNA é feita a partir de uma única amostra e em simultâneo. O material genético de várias amostras pode ser sequenciado em simultâneo e de forma independente, a partir de uma mistura de bibliotecas, permitindo a distinção e a identificação de espécies, fenómeno denominado de *barcoding* (111).

Existem várias plataformas disponíveis no mercado, que diferem entre si no que diz respeito a características bioquímicas, protocolo de sequenciação, produtividade e extensão das sequências obtidas. A escolha depende da aplicação diagnóstica, custo, velocidade, produtividade, precisão, extensão de leitura, possibilidade de *upgrading* e automatização (110).

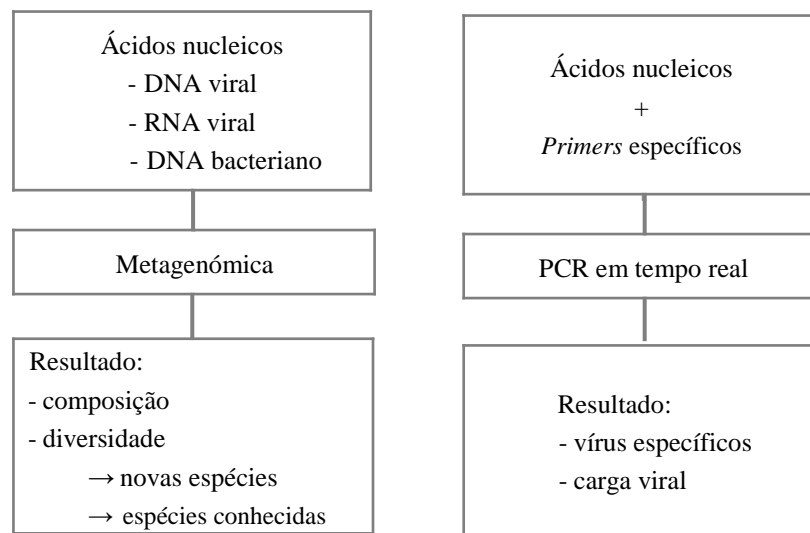
#### **1.4.6 Comparação entre PCR e análise genómica**

Em 2011, Yang *et al*, na China, fizeram um estudo com o objectivo de caracterizar o viroma respiratório, utilizando dois métodos, análise metagenómica e PCR convencional (112). Dezas seis crianças com infecção aguda das vias respiratórias inferiores foram submetidas a colheita de amostras com zaragatoa nasofaríngea. As 16 amostras foram sequenciadas, tendo sido detectadas mais de 100 espécies de vírus, a maioria correspondendo a bacteriófagos, excluídas de análise posterior. Todas as amostras com excepção de uma, foram positivas para vírus respiratórios da comunidade, nomeadamente RVh, VSR ou Adenovírus. Estes resultados corresponderam àqueles obtidos por PCR, excepto numa amostra, em que foi sequenciado EVh, não detectado por PCR.

Este estudo mostra-nos que a metagenómica dá-nos resultados comparáveis àqueles fornecidos por PCR, mas também permite a realização da análise dos subtipos virais e das relações filogenéticas. Contudo, os métodos de sequenciação não são tão sensíveis quanto os métodos de detecção por PCR, nos casos em que a quantidade de material genético viral é ínfima. Por outro lado, a sequenciação não se baseia apenas em *primers* específicos, como na PCR, permitindo a detecção de novos vírus (figura 4).

Contudo, apesar de todos os avanços tecnológicos, a determinação da causa de pneumonia é ainda um desafio. Por um lado, a obtenção de amostras do tracto respiratório inferior requer a utilização de métodos invasivos. Por outro lado, a distinção

entre colonização e infecção muitas vezes não é linear.



**Figura 4** – Comparação entre qPCR e análise metagenómica

### 1.5 Objectivos do estudo

A caracterização do viroma pulmonar é uma área em desenvolvimento, existindo poucos estudos disponíveis na literatura científica.

O conhecimento do viroma das vias aéreas inferiores em indivíduos saudáveis poderá contribuir para uma melhor percepção das alterações que surgem na doença e de que forma este conhecimento pode influenciar a abordagem e o tratamento dos doentes com infecção deste território.

Admitindo que os vírus presentes no tracto respiratório inferior sejam aqueles que habitualmente o infectam, espera-se que o viroma pulmonar seja constituído pelos vírus respiratórios. A colheita de amostras representativas deste órgão requer a utilização de métodos invasivos, pelo que o doente entubado oro-traquealmente e ventilado pareça ser o mais propício a este tipo de procedimento.

Os métodos moleculares, nomeadamente os testes de amplificação de ácidos nucleicos têm uma elevada sensibilidade e especificidade na detecção dos vírus respiratórios. A análise metagenómica vem adicionar sensibilidade na medida em que permite a detecção de todo o material genético presente nas amostras, sem que haja necessidade de conhecimento prévio dos agentes que constituem as comunidades microbianas no Homem.

Assim, o objectivo deste trabalho foi avaliar a presença de vírus respiratórios nas vias aéreas inferiores de indivíduos com e sem infecção respiratória, sob ventilação mecânica invasiva, utilizando a análise metagenómica.



## **2. Material e métodos**

### **2.1 Selecção da população estudada**

A população seleccionada para este estudo foi, indivíduos internados na Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente (UCIP) do Hospital Beatriz Ângelo (HBA) e na UCIP do Hospital de São Francisco Xavier (HSFX), no período entre a última semana de Dezembro de 2016 e os primeiros três meses de 2017.

Incluíram-se doentes sob ventilação mecânica invasiva (VMI), admitidos nas duas Unidades naquele período. Os doentes foram divididos em dois grupos, de acordo com a presença ou ausência de infecção do tracto respiratório inferior na altura da admissão. Foram excluídos os doentes com idade inferior a 18 anos, grávidas, doentes imunodeprimidos e doentes sob terapêutica antiviral na altura da admissão.

O consentimento informado foi obtido junto do doente ou do seu representante. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de ambos os hospitais.

### **2.2 Recolha de dados**

Foi realizada a recolha de dados demográficos como a idade e o género do doente, patologias crónicas associadas (Doença pulmonar crónica, Tabagismo, Insuficiência cardíaca, Diabetes tipo 2, Doença renal crónica, Acidente vascular cerebral, Cirrose hepática, Etanolismo, Neoplasia e Cirurgia no último mês), classificação de APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II*) e SAPS II (*Simplified Acute Physiology Score*) para determinar a gravidade do doente nas primeiras 24 horas após o internamento, datas de admissão e alta da UCI, duração da VMI, administração de antibiótico e destino do doente, ou seja, transferência para a enfermaria ou para o hospital de origem, ou óbito.

**Tabela 7** - Índice de gravidade APACHE II (variáveis fisiológicas + idade + doença crónica = 0-71) (*adaptado de Knaus WA, 1985*) (113).

Variáveis fisiológicas agudas (0 a 4 pontos)	Idade (anos)	Pontos	Total Pontos	Risco de mortalidade
Temperatura (°C)	< 44	0	0-4	~ 4%
Pressão arterial média (mmHg)	45-54	2	5-9	~ 8%
Frequência cardíaca	55-64	3	10-14	~ 15%
Frequência respiratória	65-74	5	15-19	~ 25%
Oxigenação	≥ 75	6	20-24	~ 40%
pH arterial			25-29	~ 55%
Bicarbonato sérico (mEq/L)			30-34	~ 75%
Sódio sérico (mEq/L)			> 34	~ 85%
Potássio sérico (mEq/L)	Doença crónica			
Creatinina sérica (mg/dL)	Insuficiência grave de órgão (hepática, cardíaca, respiratória, renal) Imunossupressão - 5 pontos se admissão por causa médica ou pós-operatório urgente - 2 pontos se pós-operatório electivo			
Hematócrito (%)				
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /mcL)				
Glasgow Coma Score*				

\* Escala que avalia o nível de consciência (3 a 15 pontos).

**Tabela 8** - Componentes do índice de gravidade SAPS II (0 a 163) (*adaptado de Le Gall JR, 1993*) (114).

Variáveis fisiológicas agudas (0 a 4 pontos)		Idade (anos)	Pontos
Frequência cardíaca	Leucócitos (10 <sup>3</sup> /mL)	< 40	0
Pressão arterial sistólica (mmHg)	Sódio sérico (mEq/L)	40-59	7
Temperatura (°C)	Bicarbonato sérico (mEq/L)	60-69	12
Oxigenação	Bilirrubina sérica (mg/dL)	70-74	15
Diurese em 24h (mL)	<i>Glasgow Coma Score</i> *	75-79	16
Ureia sérica (mg/dL)		≥ 75	18
Doença crónica	Pontos	Tipo de admissão	Pontos
Neoplasia metastizada	9	Cirurgia electiva	0
Neoplasia hematológica	10	Médica	6
SIDA	17	Cirurgia urgente	8

\* Escala que avalia o nível de consciência (3 a 15 pontos).

Os índices de gravidade APACHE II (tabela 7) e SAPS II (tabela 8) baseiam-se em três parâmetros do doente, nomeadamente a idade, as comorbilidades crónicas que conferem maior gravidade e as variáveis fisiológicas agudas que, em conjunto, permitem avaliar o risco de morte. O SAPS II entra em conta também com o tipo de admissão do doente, por causa médica, cirúrgica electiva ou cirúrgica urgente.

### 2.3 Colheita e armazenamento de amostras

Neste estudo foram utilizadas amostras de mini-lavado bronco-alveolar de indivíduos internados nas duas UCIP referidas anteriormente.

A colheita das amostras foi realizada nas primeiras 24 horas após o início da ventilação mecânica, utilizando o kit Combicath® para recolha do mini-lavado bronco-alveolar.



**Figura 5** - Combicath®

O kit Combicath® é constituído por um duplo cateter maleável de 90 cm (figura 5), obturado na extremidade distal por uma película de polietileno-glicol reabsorvível, que evita a sua contaminação durante a introdução. Esta foi realizada através do tubo oro-traqueal, com migração do cateter através da árvore traqueobrônquica até ao encravamento da extremidade distal do cateter externo. Nesta fase avançou-se o cateter interno, injectou-se 10 mL de soro fisiológico e de imediato aspirou-se o lavado bronco-alveolar. O volume de retorno variou entre 0.5 e 2 mL.

As amostras recolhidas foram colocadas em reservatórios de plástico e refrigeradas a 4°C no Laboratório de Análises Clínicas do HBA e na UCIP do HSFx e transportadas para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas. Aqui, foram aliqüotadas e congeladas a -70°C, até à sua extracção.

## **2.4 Procedimentos experimentais**

### **2.4.1 Técnicas de extracção de ácidos nucleicos**

Numa primeira fase, foi efectuada uma optimização do método de extracção, com o objectivo de obter quantidade suficiente de ácidos nucleicos virais para posterior análise metagenómica. Para tal, foram adoptados dois métodos de extracção:

- Extracção dos ácidos nucleicos com o kit QIAmp MinElute Virus Spin, QIAGEN
- Concentração das células com filtro de 0.22 µm, seguida de extracção dos ácidos nucleicos com o kit QIAmp MinElute Virus Spin, QIAGEN

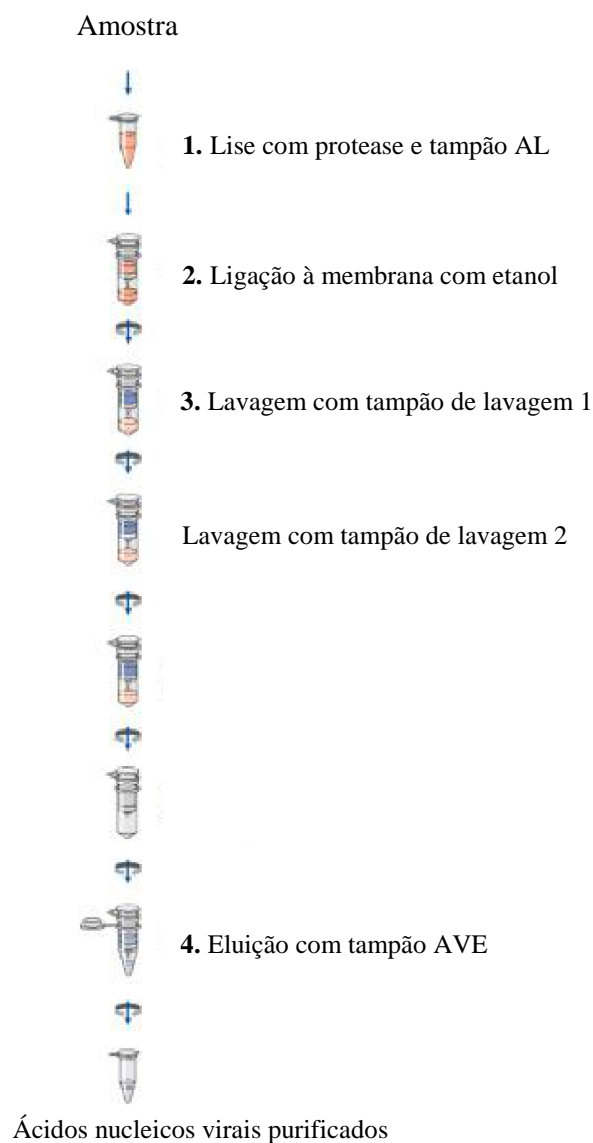
A extracção de DNA e RNA das amostras de mini-lavado bronco-alveolar foi feita utilizando o kit da QIAGEN mencionado anteriormente, de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo I), tendo sido feitas pequenas alterações.

O protocolo de extracção dos ácidos nucleicos compreende quatro fases (figura 6):

1. Fase de lise celular, em que se adiciona à amostra, protease e tampão AL (com tRNA, RNA transportador para proteger o RNA viral), que tem sais caotrópicos e detergente, ambos com função de desnaturação e digestão enzimática das proteínas e de RNases
2. Fase de ligação, em que é promovida a adsorção dos ácidos nucleicos à membrana de sílica-gel das colunas com a adição de etanol absoluto
3. Fase de lavagem, que se faz em três passos para eliminar todos os contaminantes da amostra, nomeadamente proteínas, polissacáridos, inibidores e os sais
4. Fase de eluição dos ácidos nucleicos no tampão AVE, de eluição, sendo que quanto menor o volume de eluição, maior a sua concentração



Numa primeira fase deste processo, é utilizado tRNA, que tem duas funções, nomeadamente, aumentar a afinidade dos ácidos nucleicos virais à membrana da coluna, muito importante, sobretudo se houver uma quantidade muito reduzida destes na amostra, e ainda reduzir a possibilidade de degradação de RNA viral se eventualmente as RNases não tiverem sido desnaturadas pelos sais caotrópicos e pelo tampão de lise. Se o tRNA não for adicionado ao tampão AL, pode levar à redução da recuperação de RNA ou DNA viral.



**Figura 6** - Protocolo de extracção de ácidos nucleicos

Neste trabalho, foi utilizado um volume inicial de amostra de 200  $\mu\text{L}$  e no final os ácidos nucleicos foram eluídos com 55  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  dos quais foram utilizados para cada reacção de PCR, com um volume de reacção final de 25  $\mu\text{L}$ .

Foram escolhidas duas amostras das que apresentavam maior volume, para testar as duas variantes à técnica de extracção, descritas anteriormente. Os extractos-teste obtidos foram enviados para o INSA para análise metagenómica.

### **2.4.2 Sequenciação do material genómico viral**

No processo de optimização foram realizados dois protocolos diferentes para a obtenção do material genómico viral.

#### **2.4.2.1 Primeiro ensaio**

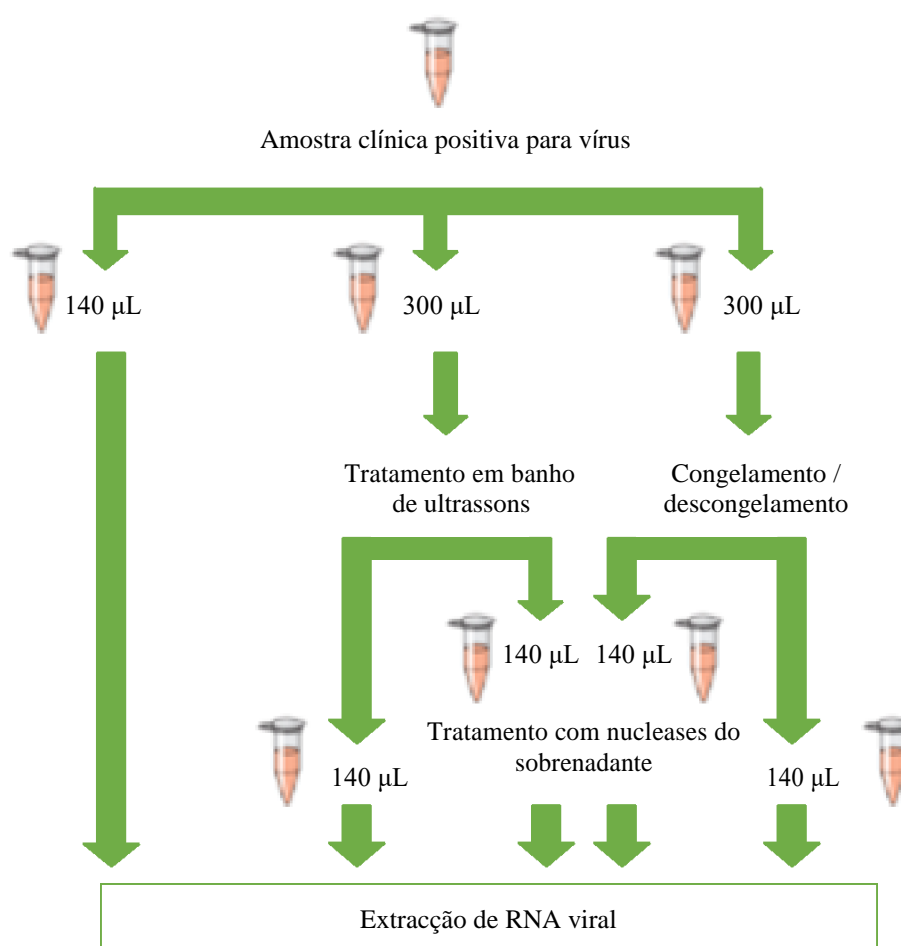
Os dois extractos de ácidos nucleicos virais anteriormente obtidos no ponto 2.4.1 foram sujeitos ao protocolo *TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation Guide* (Illumina), de acordo com as instruções do fabricante, de forma a obter DNA complementar, cDNA. Posteriormente, procedeu-se à Sequenciação de Nova Geração (2 x 150 pb) num aparelho MiSeq (Illumina), seguindo, novamente, as indicações do fabricante.

#### **2.4.2.2 Segundo ensaio**

Num segundo ensaio foi realizada uma prévia deplecção do material celular eucariota antes de se proceder à extracção dos ácidos nucleicos virais, transcrição reversa aleatória, amplificação de RNA viral e Sequenciação de Nova Geração. Para tal, efectuou-se um ensaio comparativo de cinco estratégias diferentes, aplicando ultrassons ou um processo de congelamento/descongelamento seguido da aplicação diferencial de um tratamento com nucleases (figura 7). Como material biológico inicial, recorreu-se a amostras clínicas que tinham sido testadas previamente como positivas para cinco vírus respiratórios diferentes (Rinovírus humano, Vírus Parainfluenza tipo 3, Coronavírus humano OC43, Vírus Sincicial Respiratório e Metapneumovírus humano), os quais foram apenas revelados após a análise bioinformática de forma a proceder a um *blind scoring*.

Assim, duas alíquotas gémeas de 300  $\mu$ L foram sujeitas a dois processos diferentes, uma delas a um tratamento em banho de ultrassons durante 20 segundos, por duas vezes; a outra a um processo de congelamento/descongelamento, por três vezes, a -20 °C. As amostras foram centrifugadas durante 2 minutos a 1500 rpm e, após a recuperação do sobrenadante, cada uma delas foi dividida em duas alíquotas de 140  $\mu$ L.

Uma das alíquotas de cada processo foi seguidamente sujeita a um tratamento com 140  $\mu$ L de uma solução 1:10 de nucleases em HBSS [18.5 g de DNase 400k Unidades/mg (Sigma-Aldrich) + 52.14 mg RNase 100.8k Unidades/mg (Applichem) em 4 mL de tampão HBSS], durante 20 minutos a 37 °C, seguido de inactivação enzimática 15 minutos a 65 °C e 1 minuto em gelo, antes de proceder à extracção de ácidos nucleicos.



**Figura 7** - Esquema do tratamento diferencial das amostras para depleção do material eucariota.

Paralelamente, a outra alíquota gémea de 140  $\mu$ L de cada processo, sem qualquer

tratamento, foi directamente para a extracção de ácidos nucleicos, para efeitos comparativos.

A extracção de RNA foi efectuada com o QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante com as seguintes alterações. Resumidamente, não foi adicionado tRNA à amostra, devido a possíveis interferências na sequenciação e, após a primeira lavagem com tampão AW1, procedeu-se a um tratamento com DNase “em coluna”, incubando 30 minutos com 80 µL de uma solução de DNase I (10 µL DNase I stock + 70 µL de tampão RDD; QIAGEN) aplicada directamente na coluna. Após o tratamento procedeu-se a mais uma lavagem com tampão AW1 e seguiu-se com o resto do protocolo seguindo as instruções do fabricante, eluindo no final o RNA extraído em 60 µL de tampão AVE.

#### **2.4.2.3 Transcrição reversa aleatória, amplificação de RNA viral e Sequenciação de Nova Geração**

De forma a obter o material genómico para sequenciação, recorreu-se a uma transcrição reversa aleatória do RNA viral e posterior amplificação de cDNA, segundo Ng *et al* (115). Para tal, incubou-se, durante 2 minutos a 72 °C, 5 µL de RNA viral, com 0.5 µL de dNTPs (10 mM) e 0.5 µL de *primer* N1-8N (100 µM; Anexo II), seguido de 2 minutos em gelo. De seguida, a esta mistura adicionou-se uma mistura de 0.5 µL de transcriptase reversa (*Superscript IV*; Invitrogen), 0.5 µL DTT, 0.5 µL de inibidor de RNase e 2 µL de tampão 5X, e incubou-se num termociclador com o seguinte programa: 10 minutos a 23 °C, 10 minutos a 52 °C, 10 minutos a 80 °C e um arrefecimento final a 4 °C; resultando no “produto de transcrição reversa”, consistindo numa primeira cadeia de cDNA. Para obter a segunda cadeia de cDNA, incubou-se o “produto de transcrição reversa” durante 2 minutos a 95 °C seguido de 2 minutos em gelo, ao qual se adicionou-se posteriormente 1 µL de enzima Klenow (*New England Biolabs*) e incubou-se num termociclador 60 minutos a 37 °C, seguido de 20 minutos a 75 °C, para inactivação enzimática. Este produto foi então amplificado por PCR com uma mistura, por reacção, de 2.5 µL de cDNA, 0.5 µL de *primer* N1 (100 µM; Anexo II), 2.5 µL de tampão Taq 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.63 µL de dNTP (10 mM), 0.37 µL de enzima AmpliTaq Gold (*Applied Biosystems*) e 14.5 µL de H<sub>2</sub>O, com o seguinte programa: 5 minutos a 95 °C, 5 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 59 °C e

1.5 minutos a 72 °C, 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 59 °C e 1.5 minutos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C e arrefecimento até aos 4 °C. Seria esperado que os produtos de PCR resultantes tivessem amplicões aleatórios com tamanho molecular de 150 a 500 pb. Após purificação dos produtos de PCR com *beads* AMPure XP (*Beckman Coulter*) procedeu-se ao protocolo de preparação de bibliotecas Nextera XT (*Illumina*) seguido de sequenciação (2 x 250 pb) num aparelho MiSeq (*Illumina*), de acordo com as indicações do fabricante.

#### **2.4.2.4 Análise Bioinformática**

A qualidade de todas as sequências geradas durante a sequenciação de nova geração foi analisada utilizando o *software* FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e quantificou-se o número de *reads* dedicados para cada amostra. Numa primeira fase, identificou-se para cada amostra a representatividade de *reads* dedicados a genomas virais e bacterianos, assim como ao genoma humano, recorrendo à plataforma *online* Taxonomer (116). Posteriormente, mapearam-se também os *reads* resultantes de cada amostra contra a base de dados de genomas representativos de vírus do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, descarregada no dia 16-03-2018). Numa segunda abordagem, procedeu-se com a montagem de *contigs* recorrendo ao *software* SPAdes (117) com o módulo *metaspades*, de forma a obter um maior número de sequências representativas de espécies diferentes. Todas as sequências resultantes foram alinhadas com a base de dados de vírus do NCBI, para identificação de espécies virais presentes em cada amostra.

A análise metagenómica foi realizado em colaboração com o grupo do Prof. Doutor João Paulo Gomes, do Núcleo de Bioinformática da Unidade de Investigação do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA.

#### **2.4.3 Técnica de PCR em tempo real**

Dado os resultados obtidos na análise metagenómica da primeira fase, foi necessário realizar um processo de optimização do protocolo de extracção dos ácidos nucleicos para a análise anteriormente referida. Assim, decidiu-se, em paralelo, prosseguir o estudo optando pela utilização de PCR em tempo real para a pesquisa dos possíveis

Vírus existentes na árvore brônquica distal. Foram escolhidos os seguintes: Adenovírus, Influenza A (subtipos H1 e H3), Influenza B, VPI 1 a 4, VSR A/B, EVh, RVh, MPVh, CoVh grupo 1 (229E, NL63) e CoVh grupo 2 (OC43, HKU1), e BoVh.

A amplificação dos ácidos nucleicos dos vírus respiratórios foi realizada em colaboração com a Prof.<sup>a</sup> Doutora Madalena Almeida Santos do Laboratório de Microbiologia do Hospital de Curry Cabral. A qPCR foi efectuada com sondas *Taqman* e como a seguir se descreve.

Foi utilizado como controlo interno o MS2, um plasmídeo que foi adicionado a cada amostra no processo de extracção (118).

Foi utilizada a enzima “SuperScript<sup>TM</sup> Platinum® One-Step Quantitative rtPCR system”, que combina a “SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase” e a “Platinum® *Taq* DNA Polymerase” numa única enzima. Desta forma, no mesmo passo é realizada a transcrição reversa e a amplificação.

Para além da enzima, são necessários *primers* e sondas específicas, água livre de RNases e solução tampão “2 X *reaction mix*”, que é composta por MgSO<sub>4</sub>, dNTPs e estabilizadores que criam as condições óptimas para a actuação da enzima.

A metodologia utilizada baseou-se na que foi descrita pelo grupo de Chasqueira MJ *et al* (41), na qual foi realizada a pesquisa simultânea dos vários vírus respiratórios, com quatro painéis, um *pentaplex* e três *multiplex* (tabela 9):

- Paine 1 – Influenza A e subtipos H1 e H3, Influenza B e MS2 (controlo interno)
- Paine 2 – VSR A/B, VPI 1 e 3 e Adenovírus
- Paine 3 – VPI 2 e 4, EVh, RVh e MPVh
- Paine 4 – CoVh grupo 1 (229E, NL63), CoVh grupo 2 (OC43, HKU1)

**Tabela 9** – Painéis utilizados na qPCR para pesquisa dos agentes virais em estudo no presente trabalho (\*ver sequência de *primers* e *probes* em Anexos III a VI).**Painel 1 – Pentaplex: Influenza A e subtipos H1 e H3, Influenza B e MS2**

Reagentes	Volume por reacção (µL)
Água de grau molecular	1.38
2 x RT buffer	12.5
<i>Primers / Probes</i> (P1)*	5.32
Enzima SuperScript III RT-PCR	0.8
Total	20.0

**Painel 2 – Triplex: VSR A/B, VPI 1 e 3 e Adenovírus**

Reagentes	Volume por reacção (µL)
Água de grau molecular	1.38
2 x RT buffer	12.5
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	1.5
<i>Primers / Probes</i> (P2)*	3.82
Enzima SuperScript III RT-PCR	0.8
Total	20.0

**Painel 3 – Quadriplex: VPI 2 e 4, EVh, RVh e MPVh**

Reagentes	Volume por reacção (µL)
Água de grau molecular	1.6
2 x RT buffer	12.5
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	1.0
<i>Primers / Probes</i> (P3)*	4.1
Enzima SuperScript III RT-PCR	0.8
Total	20.0

**Painel 4 – Duplex:** CoVh grupo 1 (229E, NL63), CoVh grupo 2 (OC43, HKU1)

Reagentes	Volume por reacção (µL)
Água de grau molecular	2.1
2 x RT buffer	12.5
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	1.5
<i>Primers / Probes</i> (P4)*	3.1
Enzima SuperScript III RT-PCR	0.8
Total	20.0

Foi realizado um ensaio *monoplex* adicional específico para Bocavírus humano (tabela 10).

**Tabela 10** – Painel utilizados na qPCR para pesquisa de BoVh (\*ver sequência de *primers* e *probes* em Anexo VII).

**Painel 5 – Bocavírus humano**

Reagentes	Volume por reacção (µL)
Água de grau molecular	6.2
<i>Primers / Probes</i> (P5)*	3.1
Enzima SuperScript III RT-PCR	0.8
Total	20.0

A PCR em tempo real foi realizada no RotorGene<sup>TM</sup> 6000 (Corbett Research).

Todos os ensaios tiveram condições de amplificação iguais e de acordo com o seguinte programa (tabela 11):



**Tabela 11** - Programa utilizado no RotorGene

Programa	Temperatura	Duração	Número de ciclos
Incubação	50°C	30 min	x1
Desnaturação	95°C	2 min	x1
Amplificação	95°C	15 seg	x45
(Canais: FAM e ROX)	60°C	60 seg	

A detecção foi realizada nos canais JOE, ROX, FAM e Cy5, em cada ciclo. A interpretação dos resultados foi efectuada através da análise das curvas obtidas e do valor de Ct (*Cycle threshold*), nos diferentes canais.

Todas as séries foram processadas com um controlo negativo e positivo. O controlo negativo utilizado foi a água bidestilada sem nucleases, no sentido de avaliar a presença de contaminações nos reagentes que pudessem interferir com a reacção. Como controlos positivos foram utilizadas amostras comprovadamente positivas para os vírus existentes em cada um dos painéis e como controlo interno foi utilizado, tal como anteriormente referido, o MS2, detectado no painel 1, o que permitiu validar o processamento da extracção e a inexistência de inibidores na amostra.

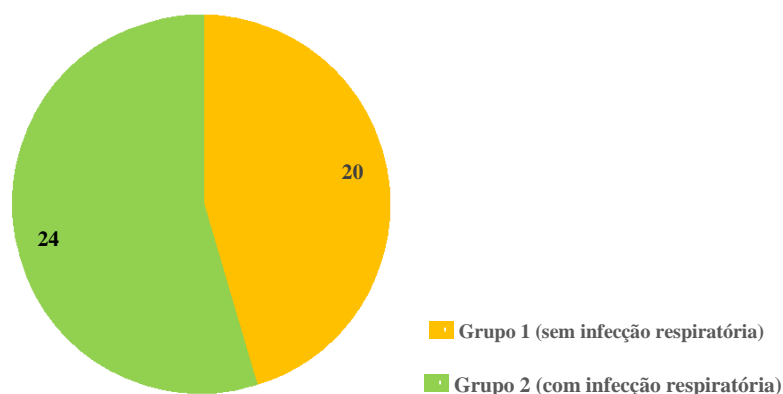
.

### 3. Resultados

#### 3.1 Características dos doentes incluídos no estudo

No período de tempo do estudo (14 semanas) foram incluídos 44 doentes, 32 da UCIP do HBA e 12 da UCIP do HSFX.

A população em estudo é constituída por 2 grupos, o Grupo 1 (G1), doentes sem infecção respiratória, representado por 20 doentes (45.4%) e o Grupo 2 (G2), doentes com infecção respiratória, por 24 doentes (54.6%) (gráfico 1).



**Gráfico 1** - Número de doentes por grupo.

A maioria dos doentes é do sexo masculino, embora esse predomínio seja mais acentuado no Grupo 1, com 60%. A média etária é de 68.3 anos, compreendida entre os 20 e os 87 anos. Contudo, verifica-se uma média etária superior no Grupo 2, de 70.7 anos, enquanto no Grupo 1 situa-se nos 65.3 anos (tabela 12).

**Tabela 12** - Dados demográficos dos doentes.

	Total	Grupo 1	Grupo 2
<b>Sexo M (%)</b>	25 (56.8%)	12 (60%)	13 (54.2%)
<b>Idade</b>	68.3 (20-87)	65.3 (20-87)	70.7 (42-87)

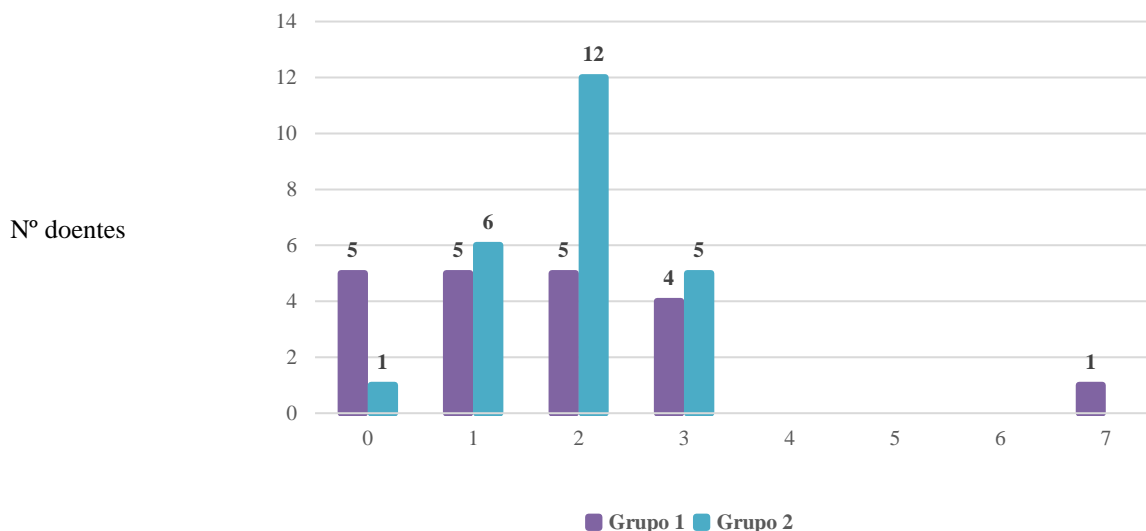
Na tabela 13 encontram-se as comorbilidades mais frequentes nesta população de doentes, verificando-se que as doenças crónicas mais comuns na população geral estão presentes nos dois Grupos de estudo, nomeadamente a Diabetes tipo 2, a Insuficiência cardíaca e a Doença pulmonar crónica. No Grupo 2 salienta-se ainda a Doença renal crónica e o Tabagismo.

**Tabela 13** - Comorbilidades da população em estudo (n = 44).

Comorbilidades	Total	Grupo 1	Grupo 2
Diabetes tipo 2	19	9	10
Insuficiência cardíaca	17	6	11
Doença pulmonar crónica	13	5	8
Doença renal crónica	7	2	5
Tabagismo	6	2	4
Etanolismo	6	3	3
Neoplasia	5	2	3
Cirrose hepática	4	3	1
AVC	1	1	0
Cirurgia < 1 mês	1	1	0

AVC – Acidente vascular cerebral

No gráfico 2 encontra-se o número de comorbilidades por doente. No Grupo 1, os doentes têm entre zero e três comorbilidades, com uma distribuição relativamente homogénea, sendo que existe apenas um doente com sete comorbilidades. No Grupo 2, verifica-se que 50% dos doentes tem duas comorbilidades, apenas um doente não tem qualquer comorbilidade, tendo os restantes entre um e três comorbilidades. Não houve diferença estatisticamente significativa (teste do qui-quadrado), quanto ao número de doentes com comorbilidades, entre os dois Grupos.



**Gráfico 2** - Número de comorbilidades por doente em cada Grupo.

Relativamente aos óbitos, verifica-se que mais de um terço dos doentes faleceu (38.6%), esta percentagem foi superior no Grupo 1, correspondente a 58.8% do total de óbitos (tabela 14). O índice de gravidade APACHE II teve um valor semelhante nos dois Grupos (G1: 22.9 vs. G2: 23.9), enquanto o SAPS II apresentou um valor mais elevado no Grupo 1 (G1: 56.3 vs. G2: 51). O número de dias de internamento foi semelhante nos dois Grupos (G1: 9.9 vs. G2: 9.6), embora os doentes do Grupo 1 tenham sido sujeitos a um maior número de dias de ventilação mecânica (G1: 7.4 vs. G2: 5.1). Apenas três quartos dos doentes sem infecção respiratória foram medicados com antibiótico, enquanto que apenas um doente com infecção respiratória na admissão não fez antibiótico.

**Tabela 14** - Comparação entre os dois Grupos relativamente à gravidade, evolução e desfecho dos doentes.

	Total	Grupo 1	Grupo 2
<b>Óbitos</b>	17 (38.6%)	10 (22.7%)	7 (15.9%)
<b>APACHE II médio</b>	23.5	22.9	23.9
<b>SAPS II médio</b>	53.4	56.3	51
<b>Nº dias internamento</b>	9.7	9.9	9.6
<b>Nº dias ventilação</b>	6.6	7.4	5.1
<b>Antibioterapia (nºdoentes)</b>	39 (88.6%)	15 (75%)	23 (95.8%)

Na tabela 15 apresenta-se uma comparação entre os doentes que sobreviveram e foram transferidos para outros serviços ou outros hospitais e aqueles que faleceram na UCI. Em primeiro lugar, está patente a assimetria que existe relativamente à gravidade dos doentes. O valor médio de ambos os índices de gravidade foi superior nos doentes falecidos, nos dois Grupos. O número de dias de internamento foi superior nos doentes que sobreviveram e o número de dias de ventilação foi sobreponível. A maioria dos falecidos, em ambos os Grupos, foi medicado com antibiótico.

**Tabela 15** - Comparação dos dados apresentados na tabela 2 considerando os doentes que sobreviveram e os falecidos.

	Grupo 1		Grupo 2	
	Transferidos	Óbitos	Transferidos	Óbitos
<b>APACHE II médio</b>	20	25.9	22.9	26.6
<b>SAPS II médio</b>	46.3	66.3	48.9	56
<b>Nº dias internamento</b>	11.9	7.9	10.8	6.6
<b>Nº dias ventilação</b>	7.4	7.3	5.2	4.8
<b>Antibioterapia (nº doentes)</b>	7 (70%)	8 (80%)	16 (94.1%)	7 (100%)

No laboratório de microbiologia dos dois hospitais foi realizada a análise microbiológica dos produtos colhidos, nomeadamente hemoculturas (HC), secreções brônquicas colhidas por aspiração através do tubo oro-traqueal (SB), lavado bronco-alveolar realizado através de broncofibroscopia (LBA), urocultura (UC) e exsudado purulento de ferida cutânea (tabela 16).

No Grupo 1 houve quatro doentes (nº 8, 41, 42 e 44) com isolamento de bactérias em SB eventualmente causadoras de infecção respiratória mas, sem que houvesse clínica de infecção com este ponto de partida. Contudo, no doente nº 42 a colheita foi realizada ao 7º dia de internamento, em relação com uma eventual pneumonia associada ao ventilador. No Grupo 2, verifica-se que apenas sete doentes num total de 24 tiveram isolamento de agente bacteriológico e, mais uma vez, duas colheitas foram realizadas após cinco dias da admissão na UCI.

**Tabela 16** – Resultado do exame cultural bacteriológico e micológico dos produtos biológicos (sangue, secreções brônquicas, urina e exsudado de ferida).

Grupo	Nº doente	Data colheita	Local	Isolado
1	1	D1	HC	<i>Candida albicans</i>
	8	D1	SB	<i>Escherichia coli</i>
	21	D2	HC	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	22	D1	HC + UC	<i>Escherichia coli</i>
	23	D1	HC + Exsudado	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	41	D3	SB	<i>Haemophilus influenzae</i>
	42	D7	SB	<i>Proteus vulgaris</i> ; <i>Klebsiella oxytoca</i>
	44	D2	SB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2	3	D3	SB	<i>Staphylococcus aureus</i>
	6	D2	SB; HC	<i>Moraxella catarrhalis</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i>
	9	D5	SB	<i>Aspergillus fumigatus</i> ; Antigénio <i>S. pneumoniae</i> +
	16	D1	LBA	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
	19	D1	SB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	30	D1	SB	<i>Moraxella catarrhalis</i>
	35	D7	LBA	<i>Staphylococcus aureus</i>

D - dia de internamento em que foi efectuada a colheita

## 3.2 Metagenómica

### 3.2.1 Ensaio piloto

Antes do início do estudo foi realizado um ensaio piloto com zaragatoas colhidas na nasofaringe preservadas em meio de transporte para vírus (*Vircell's Transport Medium for virus, Chlamydia e Mycoplasma*), que previamente tinham sido analisadas por PCR em tempo real, para verificar a adequação da metodologia ao objetivo do estudo.

Na tabela 17 estão referidos o número de *reads* dedicados a genomas virais que permitiram identificar a maioria dos vírus detectados por qPCR.

**Tabela 17** – Número de *reads* dedicados a genomas virais em cada amostra sequenciada (ensaio piloto).

Amostra	Nº de <i>reads</i> dedicados	% relativa de <i>reads</i> dedicados a genomas virais	% relativa de <i>reads</i> dedicados ao genoma humano
<b>L17-060</b>	15.667.966	0.006	70.2
<b>L08-134</b>	10.460.608	0.02	36.5
<b>L01-025</b>	11.730.410	0.003	74.0

**Tabela 18** - Vírus identificados por qPCR e por metagenómica, no ensaio piloto, utilizando duas abordagens (*software* Taxonomer e Base de dados NCBI).

Amostra	Resultados de qPCR	Vírus identificados com <i>software</i> Taxonomer	Vírus identificados com a base de dados NCBI
<b>L17-060</b>	Metapneumovírus	Metapneumovírus	Metapneumovírus Influenza A H3N2
<b>L08-134</b>	Metapneumovírus Bocavírus	Metapneumovírus Influenza A H3N2	Metapneumovírus Influenza A H3N2
<b>L01-025</b>	Coronavírus grupo 1 e 2 Influenza A H3N2	Influenza A H3N2	Influenza A H3N2

Na amostra L08-134, a percentagem relativa de *reads* dedicados a genomas virais foi mais elevada do que nas restantes, a par com uma menor percentagem de *reads* dedicados a genomas humanos, na mesma amostra. Nesta amostra foram identificados Metapneumovírus e Influenza A H3N2 através de análise metagenómica, mas não foi identificado Bocavírus, que tinha sido detectado por qPCR. Por outro lado, este último método não identificou o vírus Influenza A H3N2. Relativamente à amostra L17-060, foi identificado MPVh por ambas as técnicas, mas, mais uma vez, o vírus Influenza A H3N2 não foi identificado por qPCR. Na última amostra, L01-025 detectou-se Coronavírus dos grupos 1 e 2 através de qPCR, o que não aconteceu na análise por metagenómica (tabela 18).

### 3.2.2 Primeiro ensaio preliminar

Na primeira fase do nosso estudo realizou-se um ensaio preliminar, com duas amostras de mini-lavado bronco-alveolar, uma de cada um dos Grupos de estudo, 1 e 2 (amostras 1 e 2), extraídas por dois métodos diferentes (ponto 2.4.1 do Capítulo 2, Material e Métodos), para avaliar o número de *reads* dedicados a genomas virais e os resultados obtidos (tabela 19).



**Tabela 19** – Número de *reads* dedicados a genomas virais em cada amostra sequenciada (primeiro ensaio preliminar).

Amostra	Nº de <i>reads</i> dedicados	% relativa de <i>reads</i> dedicados a genomas virais	% relativa de <i>reads</i> dedicados ao genoma humano
<b>RNA-1</b>	3.686.986	0.002	77.4
<b>RNA-1-F-seq</b>	5.683.890	0.03	32.1
<b>RNA-2</b>	3.200.374	0	97.1
<b>RNA-2-F-seq</b>	2.813.774	0	97.2

1 e 2 – extracção com QIAmp MinElute Virus Spin kit; 1-F-seq e 2-F-seq – filtração com filtro 0.22 µm seguida de extracção com QIAmp MinElute Virus Spin kit

Comparativamente ao número de *reads* obtidos na análise das amostras de zaragatoa da nasofaringe (tabela 16), verifica-se que o número de *reads* dedicados a genomas virais é cerca de dez vezes inferior, independentemente do método de extracção de ácidos nucleicos (tabela 18).

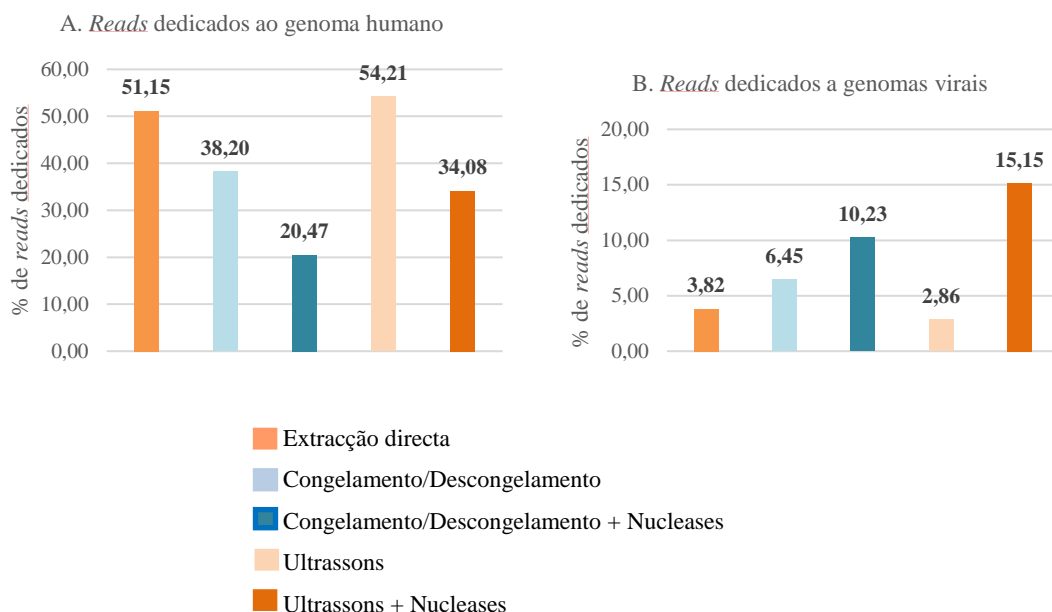
Na amostra 1, a percentagem relativa de *reads* dedicados a genomas virais foi sobreponível àquela verificada no ensaio piloto (tabela 16), sendo que a filtração prévia à extracção aumentou a percentagem relativa de *reads* dedicados a genomas virais e reduziu a percentagem relativa de *reads* dedicados ao genoma humano. Na amostra 2 não foi obtida qualquer *read* dedicado a genomas virais.

De uma forma geral, as *reads* de genomas dedicados a vírus em ambas as amostras foram muito reduzidas, provavelmente relacionado com uma elevada contaminação por genoma humano, não permitindo prosseguir o ensaio.

### 3.2.3 Segundo ensaio preliminar

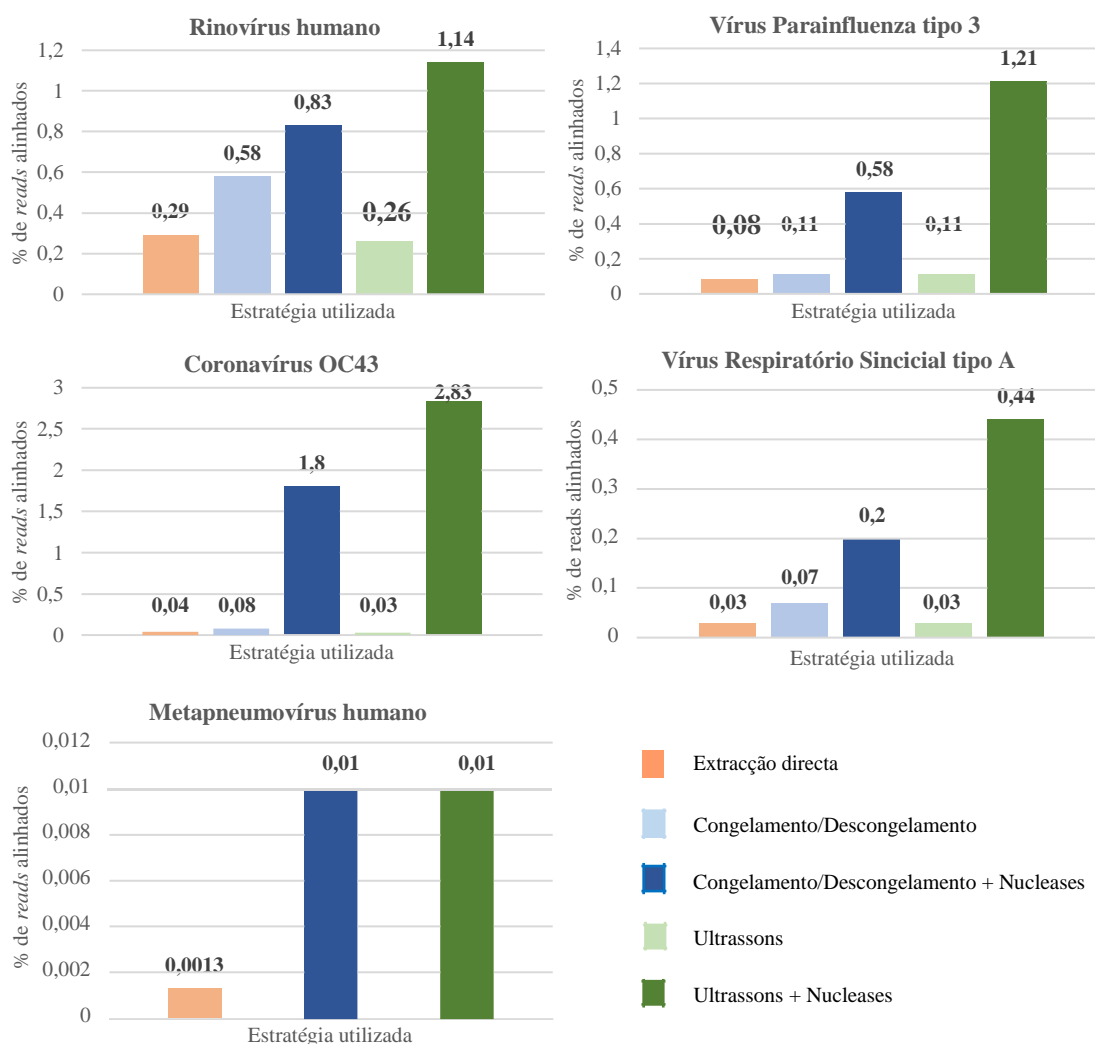
Neste ensaio testou-se a deplecção das células eucariotas tal como anteriormente explicado (ponto 2.4.2.2 do Capítulo 2, Material e Métodos), através de cinco metodologias diferentes. No gráfico 3 encontra-se o resultado deste ensaio. O método que reduziu a contaminação por genoma humano de forma mais eficaz foi o congelamento alternado com o descongelamento, seguido da adição de nucleases. Com este método, a percentagem de *reads* dedicados ao genoma humano foi de 20.5%, bastante inferior à percentagem obtida com os restantes métodos. Contudo, o método em que se obteve maior percentagem de *reads* dedicados a genomas virais foi a utilização

de ultrassons seguida da adição de nucleases.



**Gráfico 3** – Comparação do impacto das diferentes estratégias de extracção de RNA no número de *reads* dedicados a genomas virais (B) e ao genoma humano (A).

Relativamente à aplicação destes métodos na detecção individual de cinco vírus, Rinovírus humano, Virus Parainfluenza tipo 3, Coronavírus humano OC43, Vírus Sincicial Respiratório tipo A e Metapneumovírus humano (gráfico 4), verifica-se que a utilização de ultrassons seguida da adição de nucleases levou à obtenção de maior percentagem de *reads* dedicados a genomas virais, assim como o processo de congelamento alternado com descongelamento seguido da adição de nucleases, embora com um valor ligeiramente inferior. O vírus com maior percentagem de *reads* dedicados foi o Coronavírus humano OC43 e aquele com menor percentagem foi o Metapneumovírus humano.



**Gráfico 4** – Comparação das diferentes estratégias de extracção de RNA na identificação das espécies virais presentes na amostra e do seu impacto no número de *reads* dedicados a cada vírus.

### 3.3 Análise das amostras por PCR em tempo real

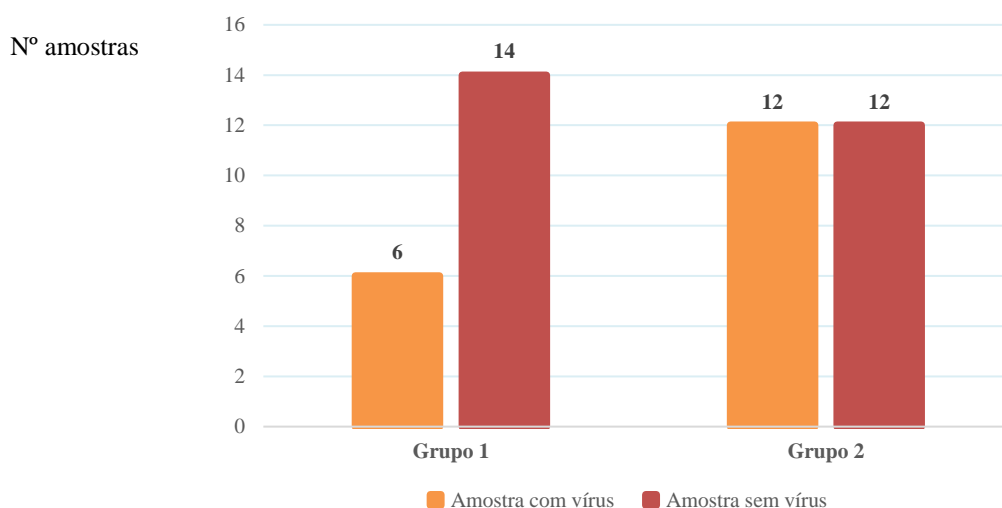
Paralelamente ao processo de optimização da análise metagenómica realizou-se a análise por qPCR das 44 amostras de mini-lavado bronco-alveolar. Os resultados da análise das 44 amostras encontram-se na tabela 20. São apresentados os vírus identificados em cada amostra e o respectivo *Cycle threshold* (Ct).

**Tabela 20** - Vírus detectados nas amostras clínicas através de qPCR e respectivos Ct's.

Grupo 1 (sem infecção)			Grupo 2 (com infecção)		
Nº amostra	Resultado	Ct	Nº amostra	Resultado	Ct
1	Influenza AH3	AH3 18.46 Gripe A 20.03	2	Negativa	-
5	Negativa	-	3	VSR	20.55
7	Negativa	-	4	Influenza AH3	AH3 14.52 Gripe A 16.50
8	VSR	16.40	6	MPVh	22.34
11	Influenza AH3 RVh	AH3 20.77 Gripe A 18.97 RVh 28.54	9	Influenza AH3	AH3 27.72 Gripe A 19.24
17	Negativa	-	10	EVh RVh	19.3 19.24
20	MPVh RVh	22.34 16.14	12	Negativa	-
21	Negativa	-	13	Negativa	-
22	Negativa	-	14	Negativa	-
23	Negativa	-	15	Negativa	-
24	Negativa	-	16	Influenza AH3 MPVh	AH3 31.86 Gripe A 30.97 MPVh 16.38
28	Negativa	-	18	VSR	23.60
29	Negativa	-	19	Negativa	-
32	Negativa	-	25	Negativa	-
33	Negativa	-	26	Negativa	-
37	Negativa	-	27	Negativa	-
39	VPI 1/3	28.78	30	MPVh BoVh	17.30 30.86
41	VPI 1/3	20.32	31	VSR	16.04
42	Negativa	-	34	RVh	23.30
44	Negativa	-	35	RVh	36.86
			36	Negativa	-
			38	BoVh	33.51
			40	Negativa	-
			43	Negativa	-

Detectaram-se vírus em 30% dos doentes do Grupo 1, sem infecção respiratória na altura

da colheita. Quanto aos doentes do Grupo 2, com infecção respiratória, foi detectada presença de vírus em 50% (gráfico 5). Na tabela 21 é possível constatar que não existe diferença estatisticamente significativa entre os dois Grupos, no que diz respeito ao número e ao tipo de vírus detectado em cada um deles, assim como relativamente aos respectivos Ct's.



**Gráfico 5** - Resultado das amostras analisadas por qPCR.

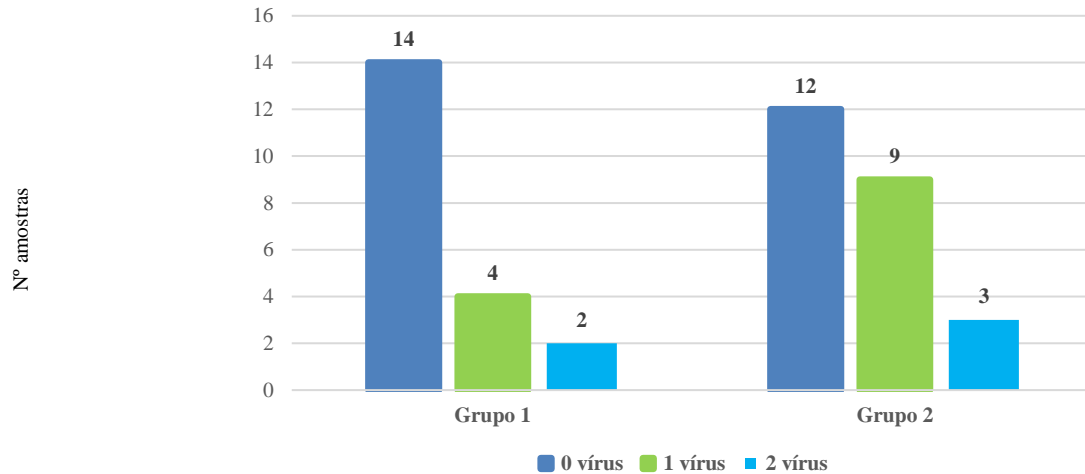
**Tabela 21** – Comparação entre o dois Grupos, quanto ao número de amostras positivas e respectivos vírus detectados.

	Grupo 1	Grupo 2	Teste exacto de Fisher
Nº amostras positivas	6	12	p = 0.38*
Infecção mista	2	3	p = 1
Influenza A(H3)	2	3	p = 1
VSR	1	3	p = 0.62
RVh	2	3	p = 1
MPVh	1	3	p = 0.62
VPI 1/3	2	0	p = 0.22
EVh	0	1	p = 1
BoVh	0	2	p = 0.49

\* efectuado Teste do qui quadrado

No gráfico 6 encontra-se o número de amostras, por grupo, sem presença de vírus, com

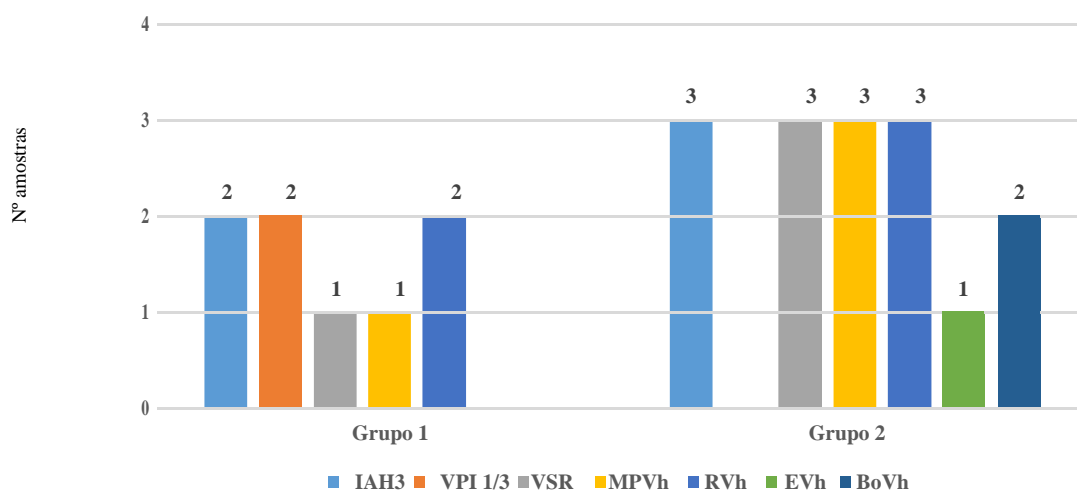
um vírus e com dois vírus, verificando-se que em ambos os grupos existem associações de vírus.



**Gráfico 6** - Número de amostras com zero, um e dois vírus.

No gráfico 7 encontram-se os vírus detectados nas amostras positivas. No Grupo 1 foram identificados os vírus Influenza AH3, VPI 1/3, VSR, MPVh e RVh. Duas amostras tinham associação de vírus, nomeadamente entre Influenza AH3 e RVh e entre MPVh e RVh. Os vírus Influenza AH3, VPI 1/3 e RVh estavam presentes em mais do que uma amostra.

No Grupo 2 identificaram-se os seguintes vírus, Influenza AH3, VSR, MPVh, RVh, EVh e BoVh. Os vírus Influenza AH3, VSR, MPVh e RVh foram, cada um deles, identificados em três amostras. O BoVh foi identificado em duas amostras e o EVh em apenas uma amostra. Verificaram-se três casos de associação de dois vírus, nomeadamente entre EVh e RVh, entre Influenza AH3 e MPVh e entre MPVh e BoVh e seis casos de co-infecção com bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae*.



**Gráfico 7** - Número de amostras do Grupo 1 e do Grupo 2 com os vírus testados

Na tabela 22 podemos confrontar a data de colheita das amostras com os vírus isolados nas mesmas. As colheitas foram realizadas na estação do inverno, verificando-se que a maioria delas foi efectuada nas primeiras semanas. A maioria das amostras foi colhida nas primeiras nove semanas e aquelas cujo resultado foi positivo foi colhida nas primeiras quatro semanas do período de tempo considerado, no início do inverno, altura em que se encontram em circulação alguns dos vírus respiratórios pesquisados.

**Tabela 22** – Data de colheita das amostras e respectivos vírus detectados.

Ano	Semana	Nºamostras	Amostras +		Vírus						
			G1	G2	IAH3	PIV1/3	VSR	MPVh	RVh	EVh	BoVh
2016	52	9	2	3	2	-	2	1	-	-	-
2017	1	5	1	2	2	-	-	1	2	1	-
	2	4	-	3	1	-	-	1	2	-	-
	3	4	1	1	-	-	1	1	1	-	-
	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	4	1	-	-	-	-	-	-	-	1
	7	5	-	1	-	1	-	-	-	-	-
	8	3	-	2	-	-	1	1	-	-	1
	9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	2	1	-	-	1	-	-	-	-	-
	12	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>		44	6	12	5	2	4	5	5	1	2

G1 – Grupo 1; G2 – Grupo 2; IAH3 - Influenza AH3

A tabela 23 permite-nos fazer uma análise dos doentes com amostras positivas e amostras negativas dentro de cada Grupo. Quanto aos doentes do Grupo 1, verifica-se que aqueles com amostras positivas (G1+) têm idade média superior à dos doentes com amostras negativas (G1-) (74.2 vs. 61.6 anos), assim como índices de gravidade com valores médios superiores (APACHE II 25.3 vs. 21.9; SAPS II 59.8 vs. 54.8). O tempo de internamento e de ventilação mecânica invasiva é inferior neste subgrupo, G1+ (4.8 vs. 12.1 dias de internamento; 2.3 vs. 9.5 dias de VMI) e a mortalidade é superior (66.7% vs. 42.9%). Relativamente às comorbilidades dos doentes de cada subgrupo, verifica-se que o G1+ tem maior percentagem de doentes com cirrose hepática, enquanto o G1- tem maior percentagem de doentes com tabagismo, diabetes tipo 2, doença renal crónica e neoplasia. No que diz respeito aos doentes do Grupo 2, a idade média é sobreponível (70.7 anos) nos dois subgrupos, G2+, com amostras positivas, e G2-, com amostras negativas. Os índices de gravidade apresentam valores mais elevados no subgrupo G2- (APACHE II 27.4 vs. 20.5; SAPS II 56.9 vs. 45). O número de dias de internamento e o número de dias de VMI é sobreponível, em ambos os subgrupos, G2+ e G2- (9.1 vs. 10 e 5.2 vs. 5.1, respectivamente). A percentagem de óbitos é inferior no subgrupo G2+ relativamente ao subgrupo G2- (16.7% vs. 41.7%). Os indivíduos com amostras positivas no Grupo 2 têm maior percentagem de doença pulmonar crónica (20.8 vs. 12.5%), insuficiência cardíaca (33.3 vs. 12.5%) e etanolismo (12.5 vs. 0%).

Comparando os subgrupos com amostras positivas, G1+ e G2+, verifica-se que os doentes do primeiro têm idade média superior (74.2 vs. 70.7 anos), valores médios de índices de gravidade superiores (APACHE II 25.3 vs. 20.5; SAPS II 59.8 vs. 45), número de dias de internamento e de VMI inferiores (4.8 vs. 9.1 e 2.3 vs. 5.2, respectivamente), assim como de percentagem de óbito (22.2% vs. 11.1%). Em relação às comorbilidades, G2+ tem maior percentagem de doentes com doença pulmonar crónica, tabagismo, insuficiência cardíaca e doença renal crónica



**Tabela 23** – Comparação entre os doentes com amostras positivas e negativas, nos dois Grupos.

	Grupo 1 (n = 20)		Grupo 2 (n = 24)	
	Vírus + (n = 6)	Vírus – (n = 14)	Vírus + (n = 12)	Vírus – (n = 12)
<b>Idade média (anos)</b>	74.2	61.6	70.7	70.7
<b>Óbito (n)</b>	4	6	2	5
<b>APACHE II médio</b>	25.3	21.9	20.5	27.4
<b>SAPS II médio</b>	59.8	54.8	45	56.9
<b>Nº dias internamento</b>	4.8	12.1	9.1	10
<b>Nº dias ventilação</b>	2.3	9.5	5.2	5.1
<b>Diabetes tipo 2</b>	20%	40%	20.8%	20.8%
<b>Insuficiência cardíaca</b>	-	-	33.3%	12.5%
<b>D. pulmonar crónica</b>	10%	15%	20.8%	12.5%
<b>D. renal crónica</b>	-	10%	8.3%	12.5%
<b>Tabagismo</b>	-	10%	8.3%	8.3%
<b>Etanolismo</b>	10%	5%	12.5%	-
<b>Neoplasia</b>	-	10%	-	12.5%
<b>Cirrose hepática</b>	10%	-	4.1%	-
<b>AVC</b>	-	5%	-	-
<b>Cirurgia &lt; 1 mês</b>	-	5%	-	-

AVC – acidente vascular cerebral



#### 4. Discussão dos resultados e Conclusão

Com este estudo foi possível a identificação de vírus respiratórios comuns em amostras do tracto respiratório inferior de indivíduos adultos sob ventilação mecânica invasiva, independentemente da presença ou não de infecção respiratória baixa, através de técnicas de PCR em tempo real. No âmbito da investigação do viroma pulmonar, são vários os factores que, no seu conjunto, tornam este estudo inovador, nomeadamente a idade e o tipo de sujeitos incluídos, o facto de haver um grupo de doentes sem infecção respiratória e um grupo controlo, constituído por doentes com infecção respiratória baixa e, ainda, o facto de as amostras serem do tracto respiratório inferior distal, cuja colheita em indivíduos não ventilados, pode ser um constrangimento.

A pesquisa efectuada na base de dados da *Pubmed* revelou a existência de milhares de artigos utilizando as palavras-chave “human [AND] microbiome” e “respiratory [AND] microbiome”, algumas centenas quando se restringiu ao pulmão “lung [AND] microbiome” e “human [AND] virome” e a poucas dezenas quando se fez nova restrição, desta vez aos vírus, “respiratory [AND] virome” e “lung [AND] virome”. Constatou-se que os estudos dedicados a este tema tiveram início nos últimos dez anos. Na sua maioria, a população alvo são crianças com infecção das vias respiratórias superiores e inferiores, sendo que as amostras analisadas são essencialmente do tracto respiratório superior. A análise laboratorial tem sido efectuada por métodos independentes da cultura, nomeadamente qPCR e análise metagenómica.

O presente estudo envolveu uma população alvo de 44 adultos com idade média na sétima década de vida, com patologia aguda grave, respiratória ou outra, motivando internamento em UCI. A mortalidade estimada de acordo com os índices de gravidade foi coincidente com a mortalidade objectivada, próxima dos 40%. Curiosamente, o número de dias de internamento e de ventilação mecânica invasiva foram inferiores nos doentes que faleceram, o que se relaciona com uma mortalidade mais precoce. A colheita de amostras do tracto respiratório inferior distal foi efectuada através de um método semi-invasivo. Segundo Luyt *et al*, o lavado bronco-alveolar é a amostra respiratória de eleição para avaliação de infecção pulmonar (119).

A extracção de ácidos nucleicos foi efectuada com o kit QIAmp MinElute Virus Spin, QIAGEN, também utilizado no estudo realizado por Wang *et al* (28), cujas amostras foram submetidas a análise metagenómica do viroma respiratório de crianças saudáveis e crianças com infecção respiratória aguda grave, com obtenção da melhor percentagem de *reads* atribuíveis a genomas virais, em comparação com estudos semelhantes (tabela 23).

**Tabela 24** – Percentagem de *reads* atribuíveis a genoma humano e a genomas virais obtidos em estudos sobre viroma pulmonar utilizando aspirados nasofaríngeos.

Primeiro autor (ano)	Número de amostras	<i>reads</i> dedicados a genoma humano	<i>reads</i> dedicados a genoma viral
Nakamura (2009)	3	90-94.6%	1.33-3.48%
Yang (2011)	16	76-95%	0.05%
Lysholm (2012)	210	-	4%
Taboada (2014)	25 IRB; 46 IRA	70-80%	0.56% IRB; 0.57% IRA
Wang (2016)	135 IR 15 saudáveis	-	2.8-64.7% (17.2) 0.1-2.9% (1.1)
Xu (2017)	50	0.26-63.4%	0.72%
Romero-Espinoza (2018)	134	71-91%	0.18-0.35%

IR – infecção respiratória; IRA – infecção respiratória alta; IRB – infecção respiratória baixa

No ensaio piloto, os resultados da análise metagenómica foram comparáveis àqueles obtidos previamente através de qPCR, utilizando o *kit* referido para a extracção dos ácidos nucleicos, apesar da percentagem relativa de *reads* dedicados a genomas virais ter sido baixo comparando com os apresentados na tabela. Por este motivo, o mesmo *kit* foi utilizado aquando da realização da extracção para o primeiro ensaio preliminar. Neste ensaio, adicionou-se um passo de filtração das duas amostras-teste gémeas, para eliminação das células eucariotas na tentativa de diminuir a percentagem de *reads* dedicados a genoma humano. Contudo, os resultados foram insatisfatórios, com valores de *reads* atribuíveis a genomas virais muito baixos, impossibilitando a sua posterior sequenciação, e a manutenção de uma elevada percentagem de *reads* atribuíveis a genomas humanos. No estudo piloto os *reads* humanos das três amostras analisadas

variaram entre 36.5 e 74% e no primeiro ensaio preliminar entre 32.1 e 97.3%, apesar do passo de filtração das amostras.

Devido ao facto inerente das amostras clínicas conterem elevada quantidade de material celular eucariota, desequilibrando o rácio de RNA eucariota/RNA viral na extracção de ácido nucleicos o que, por sua vez dificulta a sequenciação de material genómico viral, procedeu-se a diferentes estratégias para tentar a sua depleção antes da extracção, de forma a obter amostras mais “puras” de material viral. Para tal, efectuou-se um ensaio comparativo de cinco estratégias diferentes que tiveram como objectivo a destruição do material celular e genómico eucariota (i.e. humano), aplicando ultrassons ou um processo de congelamento/descongelamento seguido da aplicação diferencial de um tratamento com nucleases (figura 7, Capítulo 2, Material e Métodos). Como material biológico inicial, recorreu-se a amostras clínicas que tinham sido previamente testadas por qPCR e nas quais tinham sido identificados diferentes vírus respiratórios. Após este tratamento, na análise metagenómica foram obtidos valores de *reads* dedicados ao genoma humano mais baixos, entre 20.47% e 34.08%, após adição de nucleases aos processos de extracção de congelamento/descongelamento e aplicação de ultrassons, respectivamente. Os *reads* dedicados a genomas virais, que no estudo piloto foram de 0.003 a 0.02% e no primeiro ensaio preliminar de 0.002 a 0.03%, aumentaram para 2.86 a 15.15% no segundo ensaio preliminar. Estes valores são superiores aos observados noutros estudos (tabela 23), nomeadamente no grupo de Yang *et al*, que obteve 0.05% (112), ou de Romero-Espinoza *et al*, de 0.18-0.35% para vírus e bactérias (120), Xu *et al*, de 0.72% (29), Taboada *et al*, de 0.56-0.57% (121), Nakamura *et al*, de 1.33-3.48% (122), Lysholm *et al*, de 4% (25), mas comparáveis àqueles obtidos por Wang *et al*, com uma média de 17.2% em indivíduos infectados e 1.1% em indivíduos saudáveis (28).

A elevada percentagem de sequências genómicas humanas é um problema inerente à extracção dos ácidos nucleicos directamente das amostras respiratórias. Embora actualmente existam métodos computacionais de subtracção para remoção da contaminação de genomas do hospedeiro, são necessários passos adicionais de filtração das amostras na fase de pré-sequenciação, para eliminar as células do hospedeiro e enriquecer, assim, as amostras em genomas virais, de forma a que esta análise seja mais eficiente.

A continuação do estudo utilizando a qPCR mostrou que, de facto, existem vírus respiratórios na mucosa da árvore traqueo-brônquica distal, mesmo na ausência de infecção.

Das 20 amostras analisadas, pertencentes ao Grupo 1, 30% tinham vírus respiratórios, dos quais, Influenza AH3 (n = 2), VPI 1/3 (n = 2), RVh (n = 1), VSR (n = 1) e MPVh (n = 1). De acordo com dados de população pediátrica (28), o viroma pulmonar de indivíduos assintomáticos tem menor diversidade do que o viroma de indivíduos infectados e é constituído, sobretudo, por elementos da família *Anelloviridae*, com uma menor percentagem de vírus respiratórios epidémicos comuns. No estudo de Wang *et al*, as amostras de doentes infectados tinham seis a sete vezes mais patogéneos virais do que o grupo controlo. Este grupo sugeriu que a infecção viral pode ser assintomática e ocasionalmente prolongada, o que torna a interpretação de uma PCR positiva, para alguns vírus, controversa. No entanto, no tracto respiratório superior, a mucosa pode conter vírus de forma temporária que não fazem parte do viroma normal.

Relativamente às amostras de doentes infectados, Grupo 2, 50% das 24 amostras tinham vírus, nomeadamente Influenza AH3 (n = 3), VSR (n = 3), MPVh (n = 3), RVh (n = 3), EVh (n = 1) e BoVh (n = 2). Num estudo realizado por Choi *et al* (123), os principais vírus respiratórios associados a pneumonia grave no adulto e motivando a sua admissão em unidade de cuidados intensivos são, por ordem decrescente, RVh (23.6%), VPI (20.8%), MPVh (18.1%), Influenza (16.7%) e VSR (13.9%), de acordo com os dados obtidos a partir de análise por qPCR em amostras de lavado bronco-alveolar. No trabalho de Xu *et al* (29), foram analisadas 368 amostras colhidas com zaragatoa da nasofaringe de crianças infectadas, através de rtPCR utilizando um painel constituído por 18 vírus respiratórios comuns. A percentagem de amostras positivas foi de 58.97%. Das restantes, que foram negativas por este método, foram seleccionadas 50 amostras de forma aleatória, para serem submetidas a análise metagenómica. Dos *reads* obtidos, 0.72% correspondiam a genomas virais pertencentes, na sua maioria, às famílias *Paramyxoviridae* (foi detectada uma nova estirpe de VPI-3, com uma inserção de 32 pb no gene HN), *Herpesviridae*, *Anelloviridae* e *Polyomaviridae*.

Comparando os dois Grupos, verifica-se que em ambos o vírus Influenza AH3 é o mais frequente, coincidindo o período em que decorreu a colheita das amostras com o pico da gripe (gráfico 8). O VSR, o MPVh e o RVh são comuns a ambos os Grupos, embora com

Poder-se-á conjecturar que alguns vírus respiratórios possam colonizar transitoriamente a mucosa da árvore traqueo-brônquica nas épocas de maior actividade, como é o caso do Influenza, o VSR, o MPVh e o RVh enquanto outros, como o VPI 1/3, possam ser colonizadores mais prolongados ou perenes. No entanto, só um estudo longitudinal poderá determinar a extensão do período de colonização e assim resolver esta importante questão.

Taxa de admissão por gripe em UCI

16  
14  
12  
10  
8  
6  
4  
2  
0

40 44 48 52 04 08 12 16 20 43 47 51 03 07 11 15 19 42 46 50 02 06 10 18 41 45 49 53 04 08 12 16 20 42 46 50 02 06 10

Semanas 2012-2013 2013-2014 2014-2015 2015-2016 2016-2017

---

75

sequências presentes na amostra, permitindo a confirmação e a descoberta de novos vírus, podendo ainda identificar comunidades virais nas situações de “pneumonia viral sem agente identificado”, em que o diagnóstico virológico convencional não detectou nenhum vírus. Segundo Willner *et al* (23), os estudos baseados em PCR conferem um quadro incompleto do viroma das vias aéreas e pouca oportunidade para descoberta de novos agentes, em comparação com a metagenómica, uma técnica independente das sequências genómicas.

No presente estudo, dada a necessidade de optimização do protocolo de extracção, não foi possível realizar a análise metagenómica.

Na nossa opinião, a principal vantagem deste estudo foi a de incidir sobre uma população sob ventilação mecânica invasiva, tendo sido possível colher amostras das vias aéreas distais, embora de forma não dirigida, o que habitualmente constitui uma limitação neste tipo de estudos.

Quanto às limitações, apontamos sobretudo duas, também relacionadas com a metodologia. Em primeiro lugar, só foram pesquisados os vírus respiratórios mais comuns, não tendo sido possível a identificação de outro tipo de vírus, uma vez que, como referido, os resultados virológicos finais deste estudo basearam-se nas técnicas de qPCR. Admite-se a existência de herpesvirus na mucosa das vias aéreas distais, nomeadamente *Herpesvirus simplex* e *Cytomegalovirus*, cuja reactivação nos doentes internados em cuidados intensivos é relativamente frequente, sobretudo no contexto de ventilação mecânica prolongada (124, 125, 126). Tal como referido anteriormente, os Anelovírus parecem fazer parte do viroma pulmonar das crianças, embora a sua associação com a infecção respiratória seja controversa. Em segundo lugar, a padronização do método de extracção dos ácidos nucleicos e do processamento da informação torna-se imperativa para a implementação da análise metagenómica, não só como método de pesquisa do viroma pulmonar mas também na área do diagnóstico clínico.

Em resumo, os resultados deste estudo permitem inferir a presença de uma comunidade viral pulmonar, da qual fazem parte vírus respiratórios, que parecem colonizar esta mucosa sem determinar infecção. Outros vírus, não pesquisados através de qPCR, terão



ficado por detectar, pelo que a continuação deste estudo aplicando as estratégias de depleção do material genómico eucariota e posterior análise metagenómica às amostras alvo é um dos objectivos futuros, assim como a realização de um estudo longitudinal que permita determinar o tempo de permanência dos vírus no tracto respiratório, de forma a elucidar a existência ou não de um viroma permanente.



## Referências bibliográficas

1. Lederberg J, McCray AT. “Ome Sweet” Omics – a genealogical treasury of words. *Scientist* 2001;15:8
2. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M, NIH HMP Working group. The NIH human microbiome project. *Genome Res* 2009;19(12):2317-2323
3. Mitchell AB, Oliver BG, Glanville AR. Translacional aspects of the human respiratory virome. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194(12):1458-1464
4. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett C, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* 2007;449(7164):804-810
5. Mitchell AB, Glanville AR. The human respiratory microbiome: implications and impact. *Semin Respir Crit Care Med* 2018;39:199-212
6. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312(5778):1355-1359
7. Segal LN, Rom WN, Weiden MD. Lung Microbiome for Clinicians. *Annals ATS* 2014;11(1):108-116
8. Anderson CM, Langford RF. Bacterial content of small intestine of children in health, coeliac disease, and in fibrocystic disease of pancreas. *BMJ* 1958;1:803-806
9. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PloS Comput Biol* 2012;8(12):e1002808

10. Quigley EM. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol Hepatol* (NY) 2013;9(9):560-9
11. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbiol Ecol Health Dis* 2015;26:26191
12. Clarridge JE III. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(04):840-862
13. Zou S, Caler L, Colombini-Hatch S, Glynn S, Srinivas P. Research on the human virome: where are we and what is next. *Microbiome* 2016;4:32
14. Duerkop BA, Hooper LV. Resident viruses and their interactions with the immune system. *Nat Immunol* 2013;14:654-659
15. Minot S, Bryson A, Chehoud C, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. Rapid evolution of the human gut virome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:12450-12455
16. Lee C and Bent S. Uncovering the hidden villain within the human respiratory microbiome. *Diagnosis* 2014;1(3):203-212
17. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, Bushman FD, Collman RG. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Resp Crit Care Med* 2011;184:957-963
18. Beck JM, Schloss PD, Venkataraman A, Twigg H 3rd, Jablonski KA, Bushman FD, Campbell TB, Charlson ES, Collman RG, Crothers K, Curtis JL, Drews KL, Flores SC, Fontenot AP, Foulkes MA, Frank I, Ghedin E, Huang L, Lynch SV, Morris A, Palmer BE, Schmidt TM, Sodergren E, Weinstock GM, Young VB; Lung HIV Microbiome Project. Multicenter comparison of lung and oral microbiomes of HIV-infected and HIV-uninfected individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192(11):1335-44
19. Thorpe JE, Baughman RP, Frame PT, Wessler TA, Staneck JL. Bronchoalveolar lavage for diagnosing acute bacterial pneumonia. *J Infect Dis* 1987;155:855-61

- 
20. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, Martinez FJ, Huffnagle GB. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PloS One* 2011;6:e16384
  21. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, Curtis JL. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted Island model of lung biogeography. *Ann Am Thorac Soc* 2015;12(6):821-30
  22. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Falkowski NR, Huffnagle GB, Curtis JL. Bacterial topography of the healthy human lower respiratory tract. *MBio* 2017;8(1)
  23. Willner D, Furlan M, Haynes M, Schmieder R, Angly FE, Silva J, Tammadoni S, Nosrati B, Conrad D, Rower F. Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PloS One* 2009;4:e7370
  24. Willner D, Haynes MR, Furlan M, Hanson N, Kirby B, Lim YW, Rainey PB, Schmieder R, Youle M, Conrad D, Rohwer F. Case studies of the spatial heterogeneity of DNA viruses in the cystic fibrosis lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46:127-131
  25. Lysholm F, Wetterbom A, Lindau C, Darban H, Bjerkner A, Fahlander K, Lindberg AM, Persson B, Allander T, Andersson B. Characterization of the viral microbiome in patients with severe lower respiratory tract infections, using metagenomic sequencing. *PloS One* 2012;7:e30875
  26. Wylie KM, Mihindukulasuriya KA, Sodergren E, Weinstock GM, Storch GA. Sequence analysis of the human virome in febrile and afebrile children. *PloS One* 2012;7(6):e27735
  27. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, Avershina E, Rudi K, Narbard A, Jenmalm MC, Marchesi JR, Collado MC. The composition of the gut microbiota throughout life, with emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis* 2015;26:26050
  28. Wang Y, Zhu N, Li Y, Lu R, Wang H, Liu G, Zou X, Xie Z, Tan W. Metagenomic
-

analysis of viral genetic diversity in respiratory samples from children with severe acute respiratory infection in China. *Clin Microbiol Infect* 2016;22:458.e1-e9

29. Xu L, Zhu Y, Ren L, Xu B, Liu C, Xie Z, Shen K. Characterization of the nasopharyngeal viral microbiome from children with community-acquired pneumonia but negative for Luminex xTAG respiratory viral panel assay detection. *J Med Virol* 2017;89(12):2098-2107

30. McPhee S, Papadakis M, 2010, Pulmonary disorders, Chapter 9 *In* Rabow MW (ed), *Current Medical Diagnosis and Treatment* 2011. 50th ed, McGraw-Hill

31. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, Napolitano LM, O'Grady NP, Bartlett JG, Carratalà J, El Solh AA, Ewig S, Fey PD, File TM Jr, Restrepo MI, Roberts JA, Waterer GW, Cruse P, Knight SL, Brozek JL. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by IDSA and ATS. *Clin Infect Dis* 2016;63(5):e61-e111

32. Torres A, Niederman MS, Chastre J, Ewig S, Fernandez-Vandellos P, Hanberger H, Kollef M, Li Bassi G, Luna CM, Martin-Loeches I, Paiva JA, Read RC, Rigau D, Timsit JF, Welte T, Wunderink R. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2017;50(3)

33. Ruuskanen O, Lathi E, Jennings L, Murdoch D. Viral pneumonia. *Lancet* 2011;377:1264-75

34. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, Cox NJ, Fukuda K. Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA* 2004;292:1333-1340

35. Fendrick AM, Monto AS, Nightengale B, Sarnes M. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Arch Intern Med* 2003;163:487-494

36. Wu X, Wang Q, Wang M, Su X, Xing Z, Zhang W, Shi Y. Incidence of respiratory viral infections detected by PCR and real-time PCR in adult patients with community-

acquired pneumonia: a meta-analysis. *Respiration* 2015;89:343-352

37. Froes F, Diniz A, Mesquita M, Serrado M, Nunes B. Hospital admissions of adults with community-acquired pneumonia in Portugal between 2000 and 2009. *Eur Respir J* 2013;41:1141-1146

38. Programa Nacional para as Doenças respiratórias, Portugal – Doenças respiratórias em números – 2015, Direcção-Geral da Saúde, Fevereiro de 2016

39. CDC EPIC Study Team. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N Engl J Med* 2015;373:415-27

40. Han LL, Alexander JP, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. *J Infect Dis* 1999;179(1):25-30

41. Chasqueira MJ, Paixão P, Rodrigues ML, Piedade C, Caires I, Palmeiro T, Botelho MA, Santos M, Curran M, Guiomar R, Pechirra P, Costa I, Papoila A, Ales M, Neuparth N. Respiratory infections in elderly people: viral role in a residente population of elderly care centres in Lisbon, winter 2013-2014. *Int J Infect Dis* 2018;69:1-7

42. Chertow DS, Memoli MJ. Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review. *JAMA* 2013;309:275-282

43. Martin-Loeches I, J Shultz M, Vincent JL, Alvarez-Lerma F, Bos LD, Solé-Violán J, Torres A, Rodriguez A. Increased incidence of co-infection in critically ill patients with influenza. *Intensive Care Med* 2017;43(1):48-58

44. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrot RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;84(3):570-573

45. Ghebremedhin B. Human adenovirus: viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol* 2014;4(1):26-33

46. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Acute respiratory disease associated with adenovirus serotype 14 – four states, 2006-2007. *MMWR Morb Mortal*

Wkly Rep 2007;56:1181

47. Levent F, Greer JM, Snider M, Demmler-Harrison GJ. Performance of a new immunochromatographic assay for detection of adenoviruses in children. *J Clin Virol* 2009;44(2):173-5
48. Hodinka RL. Respiratory RNA Viruses. *Microbiol Spectrum* 2016;4(4):DMIH2-0028-2016
49. Radke JR, Cook JL. Human adenovirus infections: update and consideration of mechanisms of viral persistence. *Curr Opin Infect Dis* 2018;31(3):251-256
50. Louie JK, Kajon AE, Holodniy M, Guardia-LaBar L, Lee B, Petru AM, Hacker JK, Schnurr DP. Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat? *Clin Infect Dis* 2008;46:421
51. Khanal S, Ghimire P, Dhamoon AS. The repertoire of Adenovirus in human disease: the innocuous to the deadly. *Biomedicines* 2018;6(1):30
52. Radin JR, Hawksworth AW, Blair PJ, Faix DJ, Raman R, Russell KL, Gray GC. Dramatic decline of respiratory illness among US military recruits after the renewed use of adenovirus vaccines. *Clin Infect Dis* 2014;59(7):962-8
53. Bouvier NM, Palese P. The biology of Influenza viruses. *Vaccine* 2008;26(suppl 4):D49-53
54. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis* 2006;12(1):9-14
55. Rello J, Pop-Vicas A. Clinical review: primary influenza viral pneumonia. *Crit Care* 2009;13:23555
56. Chartrand C, Leeflang MM, Minion J, Brewer T, Pai M. Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012;156(7):500-11
57. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).



MMWR 2006;55:1-42

58. Russel E, Ison MG. Parainfluenza virus in the hospitalized adult. *Clin Infect Dis* 2017;65(9):1570-1576

59. Fry AM, Curns AT, Herbour K, Hutwagner L, Holman RC, Anderson LJ. Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990-2004. *Clin Infect Dis* 2006;43:1016

60. Falsey AR, Walsh EE. Viral pneumonia in older adults. *Clin Infect Dis* 2006;42(4):518-24

61. Choi HS, Kim MN, Sung H, Lee Jy, Park HY, Kwak SH, Lim YJ, Hong MJ, Kim SK, Park SY, Kim HJ, Kim KR, Choi HR, Jeong JS, Choi, SH. Laboratory-based surveillance of hospital-acquired respiratory virus infection in a tertiary care hospital. *Am J Infect Control* 2017;45(5):e45-e47

62. Falsey AR. Respiratory Syncytial Virus infection in adults. *Semin Respir Crit Care Med* 2007;28:171-181

63. Branche AR, Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in older adults: an under recognized problem. *Drugs Aging* 2015;32(4):261-269

64. Kestler M, Muñoz P, Mateos M, Adrados D, Bouza E. The burden of Respiratory Syncytial Virus among adults during flu season; an underestimated pathology. *J Hosp Infect* 2018;pii:S0195-6701(18)30185-3

65. Haber N. Respiratory syncytial virus infection in elderly adults. *Med Mal Infect* 2018;pii: S0399-077X(16)30734-X

66. Trang TP, Whalen M, Hilts-Horeczko A, Doernberg SB, Liu C. Comparative effectiveness of aerosolized versus oral ribavirin for the treatment of respiratory syncytial virus infections: a single-center retrospective cohort study and review of the literature. *Transpl Infect Dis* 2018;20(2):e12844

67. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA,

Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7:719

68. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Côté S, Peret TC, Erdman DD, Anderson LJ. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002;186:1330

69. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, Staat MA, Iwane M, Prill MM, Williams JV. Burden of Human Metapneumovirus infection in young children. *N Engl J Med* 2013;368(7):633-643

70. Bhattacharyya S, Gesteland PH, Korgenski K, Bjørnstad ON, Adler FR. Cross-immunity between strands explains the dynamical pattern of paramyxoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:13396

71. Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 2003;187:785

72. Johnstone J, Majumdar SR, Fox JD, Marrie TJ. Human Metapneumovirus pneumonia in adults: results of a prospective study. *Clin Infect Dis* 2008;46:571-4

73. Falsey AR, Criddle MC, Walsh EE. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. *J Clin Virol* 2006;35:46-50

74. Principi N, Esposito S. Paediatric human metapneumovirus infection: epidemiology, prevention and therapy. *J Clin Virol* 2014;59(3):141-7

75. Hamre D, Procknow, JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;121:190-193

76. McIntoch K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;57:933-940

77. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guarn Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY; SARS study group. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1319-1325
78. van der Hoek L, Pyrc K, Berkhout B. Human coronavirus NL63, a new respiratory vírus. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:760-773
79. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong H, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79:884-895
80. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012;367:1814-1820
81. Shuo S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, Liu W, Bi Y, Gao GF. Epidemiology, genetic recombination and pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol* 2016;24(6):490-502
82. Dunn JJ, Miller MB. Emerging respiratory viruses other than influenza. *Clin Lab Med* 2014;34(2):409-30
83. Yin Y, Wunderink RG. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology* 2018;23(2):130-137
84. Coleman CM, Frieman MB. Coronaviruses: important emerging human pathogens. *J Virol* 2014;88(10):5209-5212
85. To KKW, Yip CCY, Yuen KY. Rhinovirus – From bench to bedside. *J Formos Med Assoc* 2017;116:496-504
86. Stobart CC, Nosek JM, Moore ML. Rhinovirus biology, antigenic diversity, and advancements in the design of a human Rhinovirus vaccine. *Front Microbiol* 2017;8:2412

27

87. Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, Reed C, Grijalva CG, Anderson EJ, Courtney DM, Chappell JD, Qi C, Hart EM, Carroll F, Trabue C, Donnelly HK, Williams DJ, Zhu Y, Arnold SR, Ampofo K, Waterer GW, Levine M, Lindstrom S, Winchell JM, Katz JM, Erdman D, Schneider E, Hicks LA, McCullers JA, Pavia AT, Edwards KM, Finelli L, CDC EPIC Study Team. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N Engl J Med* 2015;373(5):415-

88. Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human Rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:135-162

89. Lee S, Nguyen MT, Currier MG, Jenkins JB, Strober EA, Kajon AE, Madan-Lala R, Bochkov YA, Gern JE, Roy K, Lu X, Erdman DD, Spearman P, Moore ML. A polyvalent inactivated rhinovirus vaccine is broadly immunogenic in rhesus macaques. *Nat Commun* 2016;7:12838

90. Noor A, Krilov LR. Enterovirus infections. *Pediatr Rev* 2016;37:505-515

91. Midgley CM, Watson JT, Nix WA, Curns AT, Rogers SL, Brown BA, Conover C, Dominguez SR, Feikin DR, Gray S, Hassan F, Hoferka S, Jackson MA, Johnson D, Leshem E, Miller L, Nichols JB, Nyquist AC, Obringer E, Patel A, Patel M, Rha B, Schneider E, Schuster JE, Selvarangan R, Seward JF, Turabelidze G, Oberste MS, Pallansch MA, Gerber SI; EV-D68 Working Group. Severe respiratory illness associated with a nation wide outbreak of enterovirus D68 in the USA (2014): a descriptive epidemiological investigation. *Lancet Respir Med* 2014;131:75

92. Lugo D, Krogstad P. Enteroviruses in the early 21st century: new manifestations and challenges. *Curr Opin Pediatr* 2016;28(1):107-13

93. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(36):12891-6

94. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, De Donno A, Bagordo F, Zizza A. Human bocavirus: current knowledge and future challenges. *World*

J Gastroenterol 2016;22(39):8684-8697

95. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell S, Anderson L, Erdman D, Olsen SJ. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007;195:1038-1045

96. Ghietto LM, Majul D, Ferreyra Soaje P, Baumeister E, Avaro M, Insfrán C, Mosca L, Cámara A, Moreno LB, Adamo MP. Comorbidity and high viral load linked to clinical presentation of respiratory human bocavirus infection. *Arch Virol* 2015;160:117-127

97. Moesker FM, van Kampen JJA, van der Eijk AA, van Rossum AMC, de Hoog M, Schutten M, Smits SL, Bodewes R, Osterhaus ADME, Fraaij PLA. Human bocavirus infection as a cause of severe acute respiratory tract infection in children. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2015;21(10):964.e1-8

98. Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, Magaret A, Zerr DM, Wald A, Englund JA. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *J Infect Dis* 2010;201:1625–1632

99. Peltola V, Söderlund-Venermo M, Jartti T. Human bocavirus infections. *Pediatr Infect Dis* 2013;32:178-179

100. Antunes H, Rodrigues H, Silva N, Ferreira C, Carvalho F, Ramalho H, Gonçalves A, Branca F. Etiology of bronchiolitis in a hospitalized pediatric population: prospective multicenter study. *J Clin Virol* 2010;48(2):134-6

101. Mação P, Dias A, Azevedo L, Jorge A, Rodrigues C. Acute bronchiolitis: a prospective study. *Acta Med Port* 2011;24(2):407-12

102. Paixão P, Piedade C, Papoila A, Caires I, Pedro C, Santos M, Silvestre MJ, Brum L, Nunes B, Guiomar R, Curran MD, Carvalho A, Marques T, Neuparth N. Improving influenza surveillance in Portuguese preschool children by parents' report. *Eur J Pediatr* 2014;173(8):1059-65

103. Chow BD, Huang YT, Esper FP. Evidence of human bocavirus circulating in children and adults, Cleveland, Ohio. *J Clin Virol* 2008;43(3):302-6
104. Garbino J, Soccacal PM, Aubert JD, Rochat T, Meylan P, Thomas Y, Tapparel C, Bridevaux PO, Kaiser L. Respiratory viruses in bronchoalveolar lavage: a hospital-based cohort study in adults. *Thorax* 2009;64(5):399-404
105. Ginocchio CC, McAdam AJ. Current best practices for respiratory virus testing. *J Clin Microbiol* 2011;49(9):S44-S48
106. Pérez-Ruiz M, Corral IP, Sanbonmatsu-Gámez S, Navarro-Marí JM. Laboratory detection of respiratory viruses by automated techniques. *Open Virol J* 2012;6:151-9
107. Datta S, Budhauriya R, Das B, Chatterjee S, Vanlalhmua, Veer V. Next-generation sequencing in clinical virology: discovery of new virus. *World J Virol* 2015;4(3):265-276
108. Loeffelholz M, Chonmaitree T. Advances in diagnosis of respiratory virus infections. *Int J Microbiol* 2010;2010:126049
109. Pallen MJ. Diagnostics metagenomics: potential applications to bacterial, viral and parasitic infections. *Parasitology* 2014;141:1856-1862
110. Barzon L, Lavezzo E, Constanzi G, Franchin E, Toppo S, Palu G. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. *J Clin Virol* 2013;58(2):346-50
111. Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC, Hall N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol* 2012;93:1853-1868
112. Yang J, Yang F, Ren L, Xiong Z, Wu Z, Dong J, Sun L, Zhang T, Hu Y, Du J, Wang J, Jin Q. Unbiased parallel detection of viral pathogens in clinical samples by use of a metagenomic approach. *J Clin Microbiol* 2011;49:3463-3469
113. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13(10):818-29

- 
114. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on a European/North American Multicenter Study. *JAMA* 1993;270(24):2957-2963
115. Ng TF, Kondov NO, Deng X, Van Eenennaam A, Neibergs HL, Delwart E. Metagenomics and case-control study to identify viruses associated with bovine respiratory disease. *J Virol* 2015;89:5340-5349
116. Flygare S, Simmon K, Miller C, Qiao Y, Kennedy B, Di Sera T, Graf EH, Tardif KD, Kapusta A, Ryneerson S, Stockmann C, Queen K, Tong S, Voelkerding KV, Blaschke A, Byington CL, Jain S, Pavia A, Ampofo K, Eilbeck K, Marth G, Yandell M, Schlager R. Taxonomer: an interactive metagenomics analysis portal for universal pathogen detection and host mRNA expression profiling. *Genome Biol* 2016;17(1):111
117. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Mol Cell Biol* 2012;19:455–477
118. Rolfe KJ, Parmar S, Mururi D, Wreghitt TG, Jalal H, Zhang H, Curran MD. An internally controlled, one-step, real-time RT-PCR assay for norovirus detection and genogrouping. *J Clin Virol* 2007;39(4):318-21
119. Luyt CÉ, Kayser L. Virus detection in patients with severe pneumonia: still more questions than answers? *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(4):301-2
120. Romero-Espinoza JA, Moreno-Valencia Y, Coronel-Tellez RH, Castillejos-Lopez M, Hernandez A, Dominguez A, Miliar-Garcia A, Barbachano-Guerrero A, Perez-Padilla R, Alexandre-Garcia A, Vasquez-Perez JÁ. Virome and bacteriome characterization of children with pneumonia and asthma in Mexico City during winter seasons 2014 and 2015. *PloS One* 2015;13(2):e0192878
121. Taboada B, Espinoza MA, Isa P, Aponte FA, Arias-Ortiz MA, Monge-Martínez J, Rodríguez-Vázquez R, Dáz-Hernández F, Zárate-Vidal F, Wong-Chew RM, Firo-Reyes
-

V, del Río-Almendárez CN, Gaitán-Meza J, Villaseñor-Sierra A, Martínez-Aguilar G, Salas-Mier Mdel C, Noyola DE, Pérez-González LF, López S, Santos-Preciado JI, Arias CF. Is there still room for novel viral pathogens in pediatric respiratory tract infections? *PloS One* 2014;9(11):e113570

122. Nakamura S, Yang C-S, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, Goto N, Takahashi K, Yasunaga T, Ikuta K, Mizutani T, Okamoto Y, Tagami M, Morita R, Maeda N, Kawai J, Hayashizaki Y, Nagai Y, Horii T, Iida T, Nakaya T. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. *PloS One* 2009;4(1):24219

123. Choi HS, Hong SB, Ko GB, Lee Y, Park HJ, Park SY, Moon SM, Cho OH, Park KH, Chong YP, Kim SH, Huh JW, Sung H, Do KH, Lee SO, Kim MN, Jeong JY, Lim CM, Kim YS, Woo JH, Koh Y. Viral infection in patients with severe pneumonia requiring intensive care unit admission. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(4):325-32

124. Luyt CÉ, Combes A, Trouillet JL, Nieszkowska A, Chastre J. Viral infections in the ICU. *Curr Opin Crit Care* 2008;14(5):605-8

125. Luyt CÉ, Combes A, Trouillet JL, Nieszkowska A, Chastre, Virus-induced acute respiratory distress syndrome: epidemiology, management and outcome. *Presse Med* 2011;40(12 Pt2):e561-8

126. Forel JM, Martin-Loeches I, Luyt CE. Treating HSV and CMV reactivations in critically ill patients who are not immunocompromised: pro. *Intensive Care Med* 2014;40(12):1945-9



## **ANEXOS**



---

## ANEXO I

### Protocolo de extracção de ácidos nucleicos - kit QIAamp MinElute Virus Spin, QIAGEN

- 1) Pipetar 200 µL de amostra
- 2) Adicionar 25 µL de protease QIAGEN e agitar no vórtex 15 segundos
- 3) Adicionar 200 µL da mistura A (tRNA 28 µg/mL + tampão AL) e agitar no vórtex 15 segundos
- 4) Adicionar 11 µL de MS2 (plasmídeo com concentração de  $10^{-4}$ ) e agitar no vórtex 15 segundos
- 5) Incubar no termobloco a 56°C durante 15 minutos
- 6) Centrifugar para remover eventuais gotas presentes na tampa
- 7) Adicionar 250 µL de etanol absoluto e agitar no vórtex 15 segundos
- 8) Incubar o lisado com o etanol durante 5 minutos à temperatura ambiente
- 9) Centrifugar brevemente para remover eventuais gotas presentes na tampa
- 10) Aplicar o lisado na coluna QIAamp MinElute e centrifugar a 10.000 rpm durante 1 minuto
- 11) Adicionar 450 µL de tampão AW1 e centrifugar a 10.000 rpm durante 1 minuto
- 12) Adicionar 450 µL de tampão AW2 e centrifugar a 10.000 rpm durante 1 minuto
- 13) Centrifugar à velocidade máxima, 14.000 rpm, 3 minutos
- 14) Colocar a coluna no *ependorf* de 1.5 mL e aplicar 55 µL de tampão AVE no centro da membrana
- 15) Incubar à temperatura ambiente 5 minutos e centrifugar à velocidade máxima, 14.000 rpm, durante 2 minutos
- 16) Congelar o extracto obtido



**ANEXO II**

*Primers* utilizados para transcrição reversa e amplificação aleatória de RNA viral.

<b>Designação</b>	<b>Sequência nucleotídica</b>
N1-8N	CCTTGAAGGCGGACTGTGAGNNNNNNNN
N1	CCTTGAAGGCGGACTGTGAG



## ANEXO III

**Painel 1 - Pentaplex: Influenza A e subtipos H1 e H3, Influenza B e MS2**

Reagentes para 1 reacção	Volume (µL)	Nº amostras + 2
<b>2 x RT buffer (Invitrogen)</b>	12.5	
<b>H1 Sw For (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – TCA ACA GAC ACT GTA GAC ACA GTA CT -3'		
<b>H1 Sw Rev (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – GTT TCC CGT TAT GCT TGT CTT CTA G -3'		
<b>H1 Sw Probe (10 pmol/µL)</b>	0.3	
5' – FAM- ACA GAG TGT GTY ACT GT – MGBNFQ -3'		
<b>AM-F (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – GAG TCT TCT AAC MGA GGT CGA AAC GTA -3'		
<b>AM-R (20 pmol/µL)</b>	1.0	
5' – GGG CAC GGT GAG CGT RAA -3'		
<b>AM Probe (10 pmol/µL)</b>	0.4	
5' – VIC-TCC TGT CAC CTC TGA C-MGBNFQ -3'		
<b>BNP-F (20 pmol/µL)</b>	0.16	
5' - GCA GCT CTG ATG TCC ATC AAG CT -3'		
<b>BNP-R (20 pmol/µL)</b>	0.16	
5' – CAG CTT GCT TGC TTA RAG CAA TAG GTC T -3'		
<b>BNP Probe (3.3 pmol/µL)</b>	0.2	
5' -Cy5-CCA GAT CTG GTC ATT GGR GCC CAR AAC TG-BHQ3 -3'		
<b>MS2 F1 (20 pmol/µL)</b>	0.1	
5' – TGG CAC TAC CCC TCT CCG TAT TCA CG -3'		
<b>MS2 R1 (20 pmol/µL)</b>	0.1	
5' – GTA CGG GCG ACC CCA CGA TGA C -3'		
<b>MS2 Taq (10 pmol/µL)</b>	0.2	
5' Rox- CAC ATC GAT AGA TCA AGG TGC CTA CAA GC-BHQ2 -3'		
<b>Superscript III Platinum One-step Qrt-PCR Enzyme (Invitrogen)</b>	0.8	
<b>RNase Free Water</b>	2.58	
<b>Total Volume</b>	20.0	





**ANEXO IV****Painel 2 - Triplex: VSR A/B, VPI 1 e 3 e Adenovírus**

Reagentes para 1 reacção	Volume (µL)	Nº amostras + 2
<b>2 x RT buffer</b>	12.5	
<b>MgSO<sub>4</sub> (50 mM)</b>	1.5	
<b>RSV For (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – GGG WGG WGA AGC WGG ATT CTA CC -3'		
<b>RSV Rev (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – ACC TCT RTA CTC TCC CAT TAT GCC TAG -3'		
<b>RSV Probe (10 pmol/µL)</b>	0.2	
5' – FAM- TAG GCA ATG CWG C – MGB -3'		
<b>NP1 For (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – GCY CCTTTYATATGTATACTCAGAGACCCA -3'		
<b>NP1 Rev (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – TGTCTCTCCAGTTACATAYTGTTCATAGC -3'		
<b>NP3 For (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – GCTCCTTTYATCTGTATCCTCAGAGATCC -3'		
<b>NP3 Rev (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' - TGATCTTCCCGTCACATACTGTTGCATG -3'		
<b>NP13 Probe (10 pmol/µL)</b>	0.2	
5' – Joe-TGGAGYTAYGCAATGGG-MGB -3'		
<b>Ad For (20 pmol/µL)</b>	0.16	
5' -GCC CCA RTG GKC NTA CAT GCA CAT C -3'		
<b>Ad Rev (20 pmol/µL)</b>	0.16	
5' – GCC ACX GTG GGR TTY CTR AAC TT -3' /X= Inosin		
<b>Ad Rev (10 pmol/µL)</b>	0.1	
5' – CY5-TGC ACC AGA CCC GGR CTC AGR TAC TCC GA-BHQ3-3'		
<b>RT Enzyme</b>	0.8	
<b>RNase Free Water</b>	1.38	
<b>Total Volume</b>	20.0	



## ANEXO V

**Painel 3 - Quadriplex: VPI 2 e 4, EVh, RVh e MPVh**

Reagentes para 1 reacção	Volume (µL)	Nº amostras + 2
<b>2 x RT buffer</b>	12.5	
<b>MgSO<sub>4</sub> (50 mM)</b>	1.0	
<b>Ent / Rhino For (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – CGG CCC CTG AAT GYG GCT AA -3'		
<b>Ent / Rhino Rev (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA -3'		
<b>Rhino Probe (10 pmol/µL)</b>	0.3	
5' – JOE-TCY GGG AYG GGA CCR ACT A – MGB -3'		
<b>Entero Probe (10 pmol/µL)</b>	0.3	
5' – FAM-TCT GYR GCG GAA CCG ACT - MGB -3'		
<b>hMPV For (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – CAT CAG GTA AYA TCC CAC AAA AYC AG -3'		
<b>hMPV Rev (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – GTG AAT ATT AAR GCA CCT ACA CAT AAT AAR A -		
<b>3' hMPV Probe (10 pmol/µL)</b>	0.3	
5' - CY5-CCY TCA GCA CCA GAC ACA CC-BHQ3 -3'		
<b>NP2 For (20 pmol/µL)</b>	0.25	
5' – AAGTGYATGACTGCTCCTGATCARCC -3'		
<b>NP2 Rev (20 pmol/µL)</b>	0.25	
5' -TTGCCAATRTCTCCCACCATRG CATA -3'		
<b>NP4 For (20 pmol/µL)</b>	0.25	
5' – AAATGYATGACAGCTTATGATCAACCCA-3'		
<b>NP4 Rev (20 pmol/µL)</b>	0.25	
5' – TTTGCAATRTCTCCCACCATRG CATA-3'		
<b>NP2 Probe (10 pmol/µL)</b>	0.1	
5'ROX-TCAGAATGCCATCCGCAAGTCAATGG-BHQ2-3'		
<b>NP4 Probe (10 pmol/µL)</b>	0.1	
5'ROX-CAGC9GGATAAARGTAGGTGCTTATACTAACAG-BHQ2-3'		

Reagentes para 1 reacção	Volume (µL)	Nº amostras + 2
RT Enzyme	0.8	
RNase Free Water	1.6	
Total Volume	20.0	

## ANEXO VI

**Painel 4 – Duplex: CoVh grupo 1 (229E, NL63), CoVh grupo 2 (OC43, HKU1)**

Reagentes para 1 reacção	Volume (µL)	Nº amostras + 2
<b>2 x RT buffer</b>	12.5	
<b>MgSO<sub>4</sub> (50 mM)</b>	1.5	
<b>Cor For (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – ATG GGT TGG GAY TAT CCI AAR TGT GA -3'		
<b>Cor R1 (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – GCA GTA GTT GCA TCA CCA CTR CTA GT -3'		
<b>Cor R2 (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – GCT GTA CTA GCR TCA CCA GAA GT -3'		
<b>Cor R3 (10 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – GCT GTA GTT GCR(A) TCA CCA GAA GT -3'		
<b>Cor R4 (20 pmol/µL)</b>	0.5	
5' – AGC AGT TGT AGC ATC ACC GGA TGA T -3'		
<b>GP1 Probe (10 pmol/µL)</b>	0.2	
5' – FAM-TTR GGY TCT AAG CAT GTY A-MGB -3'		
<b>GP2 Probe (10 pmol/µL)</b>	0.2	
5' - VIC-CTT GCG AAT GAA TGY GC-MGB -3'		
<b>RT Enzyme</b>	0.8	
<b>RNase Free Water</b>	2.3	
<b>Total Volume</b>	20.0	



## ANEXO VII

**Painel 5 – BoVh**

Reagentes para 1 reacção	Volume (µL)	Nº amostras + 2
<b>Enzima SuperScript III RT-PCR</b>	12.5	
<b>Boca For (20 pmol/µL)</b>		
5' – CAC KCC CAG GAA RTG ACG TAT -3'	0.5	
<b>Boca Rev (20 pmol/µL)</b>		
5' – CCA GAG ATG TTC ACT CGC CGG A -3'	0.5	
<b>Boca Probe (10 pmol/µL)</b>		
5' – FAM-TCA GAC TGC ATC CGG TCT-MGB -3'	0.3	
<b>RNase Free Water</b>	6.2	
<b>Total Volume</b>	20.0	